

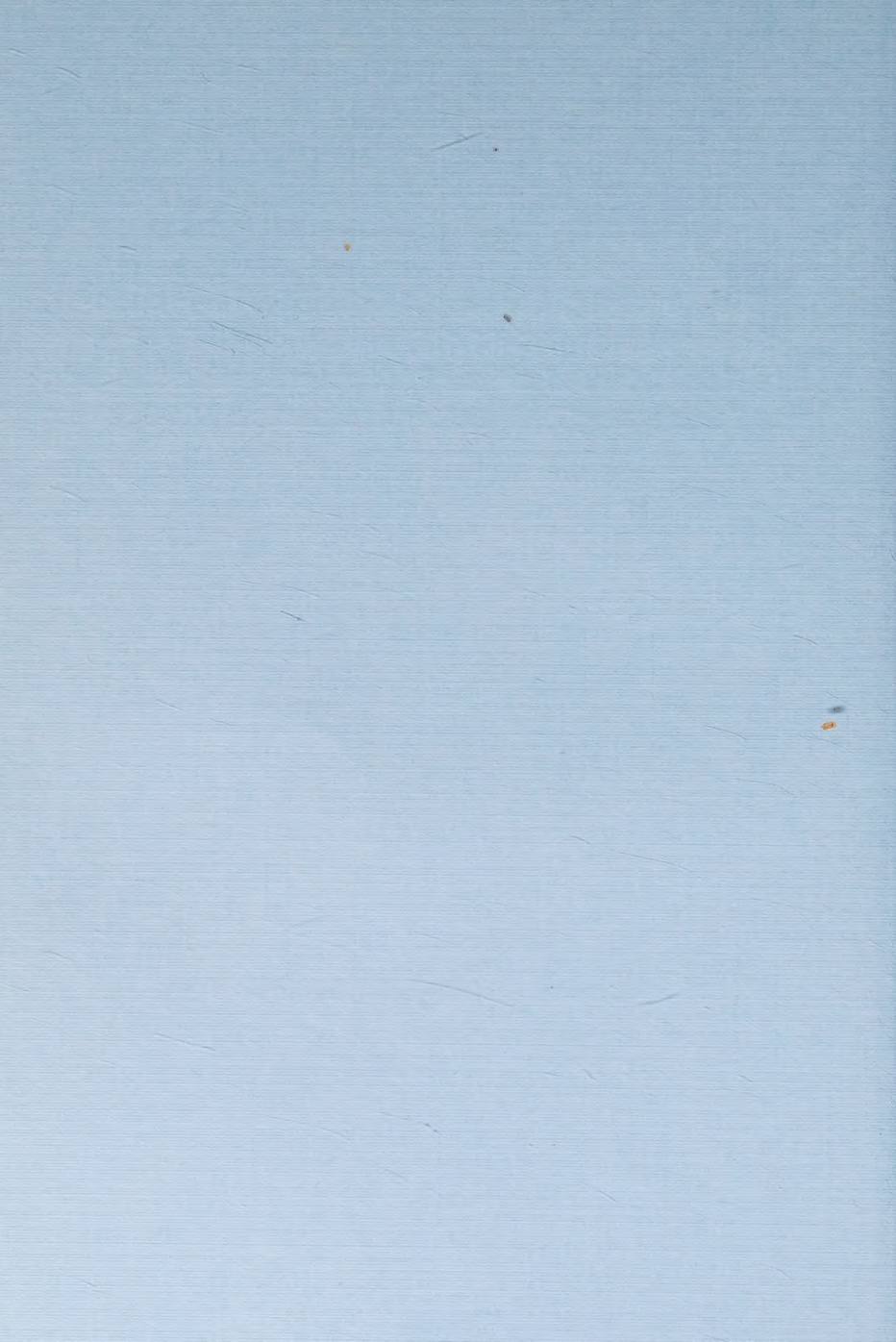
**Die Hemmung der menschlichen Serum-Pseudo-
cholinesterase (EC 3.1.1.8) in vitro durch E 600 und
ihre Reaktivierbarkeit mit PAM unter Berücksichtigung
von Temperatur, Zeit und fermentativer E 600-Spaltung**

von

Dr. med. Helmut Heinrich Lindorf

aus

Berlin



Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. Dr. E. Weinig

**Die Hemmung der menschlichen Serum-Pseudo-
cholinesterase (EC 3.1.1.8) in vitro durch E 600 und
ihre Reaktivierbarkeit mit PAM unter Berücksichtigung
von Temperatur, Zeit und fermentativer E 600-Spaltung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Dr. med. Helmut Heinrich Lindorf

aus

Berlin

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen - Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. Dr. H. Pauly
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt
Koreferent: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 9. 1972

Meinen Eltern

und meinem Onkel

ltd. Chefarzt Dr. med. Gerhard Weber

gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. <u>Einleitung</u>	1
I. Allgemeines über die Alkylphosphate E 600 und E 605 und die Pseudocholinesterase (PChE)	1
II. Enzymatische Spaltung von E 600 im Serum	4
III. Wirkungsweise, Vergiftung und Reaktivierung der Serumcholinesterasen	6
1. Hydrolyse von Acetylcholin durch die Cholinesterasen	7
2. Reaktion mit Phosphorsäureestern	8
a) Phosphorylierung der Cholinesterase	8
b) Spontane Reaktivierung und Alterung	9
c) Induzierte Reaktivierung	10
B. <u>Problemstellung</u>	12
C. <u>Eigene Untersuchungen</u>	15
I. Einfluß von Temperatur und Zeit auf die Akti- vität und Reaktivierbarkeit durch PAM der mit E 600 vergifteten Serumcholinesterase	15
1. Experimentelle Bedingungen	
a) Gewinnung und Aufteilung des Serums	15
b) Herstellung der unvergifteten Serumansätze	16
c) Methodik der Vergiftung	16
d) Methodik der Reaktivierung der mit E 600 vergifteten Seren	17
e) Durchführung des Versuchs	18
f) Auswertung der Versuchsergebnisse	20

2. Ergebnisse der Untersuchungen der unvergifteten, der mit E 600 vergifteten und der mit E 600 vergifteten und mit PAM reaktivierten Serumcholinesterasen unter Berücksichtigung von Temperatur und Zeit	20
a) Die Änderung der Normalaktivität nach Aufbewahrung der Seren über 8 Tage bei 5°C im Kühlschrank und bei 37°C im Wasserbad	20
b) Die Spontanreaktivierung der mit E 600 ($c = 3 \times 10^{-6}$ mol) vergifteten Seren während der Aufbewahrung über 8 Tage bei 5°C im Kühlschrank und bei 37°C im Wasserbad	26
α) Versuchsergebnisse der vergifteten und bei 5°C aufbewahrten Seren	26
β) Versuchsergebnisse der vergifteten und bei 37°C aufbewahrten Seren	27
γ) Vergleich der Versuchsergebnisse der bei 37°C und 5°C aufbewahrten Seren	28
c) Die Reaktivierbarkeit durch PAM der mit E 600 in 3×10^{-6} molarer Konzentration vergifteten Seren während der Aufbewahrung über 8 Tage bei 5°C im Kühlschrank und bei 37°C im Wasserbad	34
α) Versuchsergebnisse der mit E 600 vergifteten Seren bei sofortiger Reaktivierung durch PAM	34
β) Versuchsergebnisse der bei 37°C über 8 Tage aufbewahrten Seren nach Reaktivierung mit PAM	35
δ) Vergleich der Reaktivierbarkeit durch PAM der bei 37°C aufbewahrten mit den bei 5°C aufbewahrten Seren	42

d) Vergleich zwischen Zunahme der Spontanreaktivierung und Abnahme der Reaktivierbarkeit durch PAM	42
α) Vergleich der Spontanreaktivierung und Abnahme der Reaktivierbarkeit durch PAM der bei 5°C aufbewahrten Seren	43
β) Vergleich der Spontanreaktivierung und Abnahme der Reaktivierbarkeit der bei 37°C aufbewahrten Seren	43
γ) Verlauf aller erhaltenen Kurven der bei 37°C aufbewahrten Seren	44
e) Vergleich zwischen Höhe der Anfangsreaktivierbarkeit durch PAM und Zeitpunkt der Beendigung der Reaktivierungsmöglichkeit durch PAM	44
f) Reaktivierbarkeit der PChE durch PAM direkt nach Vergiftung mit E 600 in 3×10^{-6} molarer Konzentration bei geringerer PAM-Konzentration	46
II. Die unterschiedliche Reaktivierbarkeit der mit E 600 vergifteten Serumcholinesterase durch eine 5×10^{-5} mol. PAM-Lösung und die Beziehung der fermentativen E 600-Spaltung im Serum	46
a) Die unterschiedliche Reaktivierbarkeit der Serumcholinesterase durch eine 5×10^{-3} mol. PAM-Konzentration	48
b) Die unterschiedliche Reaktivierbarkeit der mit E 600 in $1,5 \times 10^{-7}$ mol. Konzentration vergifteten Serumcholinesterase durch eine 5×10^{-4} mol. PAM-Lösung	50
c) Versuch einer Deutung der unterschiedlichen Reaktivierungswerte durch PAM bei den mit E 600 vergifteten Seren	51

	Seite
D. <u>Diskussion</u>	52
E. <u>Zusammenfassung</u>	54
F. <u>Literaturverzeichnis</u>	58

Die Hemmung der menschlichen Serum-Pseudocholinesterase
(EC 3.1.1.8) in vitro durch E 600 und ihre Reaktivierbarkeit
mit PAM unter Berücksichtigung von Temperatur, Zeit
und fermentativer E 600 - Spaltung

A. Einleitung

I. Allgemeines über die Alkylphosphate E 600 und E 605
und die Pseudocholinesterase (PChE)

Vergiftungen durch Schädlingsbekämpfungsmittel aus der Gruppe der organischen Phosphorsäureester, in erster Linie E 605, beschäftigen immer wieder den Gerichtsmediziner. Es ist bisher nicht gelungen, diese hochgiftigen Alkylphosphate durch gegen Insekten ebenso wirksame, aber für den Warmblüter weniger toxische Verbindungen zu ersetzen.

Diese Verbindungen können accidentell auftreten, etwa durch mangelhafte Schutzmaßnahmen oder unsachgemäße Anwendung und Aufbewahrung. Sie spielen aber vor allem bei Selbstmorden wegen ihrer leichten Erreichbarkeit und sicheren Wirkung eine Rolle. Auch Mordfälle wurden bekannt.

Vergiftungen mit Alkylphosphaten sind heute oft schon durch chemische Untersuchungen von Mageninhalt und Urin nachweisbar. Manchmal aber fehlen chemische Verfahren, oder ihre Spezifität ist nicht ausreichend. In allen diesen Fällen kann ein Anhalt für eine Alkylphosphatvergiftung durch den Nachweis der Blockierung der

Cholinesterasen, nämlich der Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) (AChE) in Erythrozyten und Organen und der Pseudocholinesterase (EC 3.1.1.8) (PChE), besonders im Serum, dem wahrscheinlichen Hauptangriffspunkt der organischen Phosphorsäureester, gewonnen werden. (Friedberg und Sakai, 1968)

Diese beiden Fermente hydrolysieren die Phosphorsäureester und gehen mit dem einen Spaltprodukt eine relativ stabile Verbindung ein. Daher hält die Blockierung der Fermente längere Zeit.

Doch stößt die Deutung der gemessenen niedrigen oder fehlenden Aktivität auf folgende Schwierigkeiten (gekürzt und ergänzt nach der Zusammenstellung von Friedberg und Sakai, 1958).

1. Die Aktivität der Cholinesterasen, vor allem der Pseudocholinesterase, doch auch der echten Cholinesterase in den Erythrozyten, streut erheblich.
2. Verschiedene Erkrankungen, z.B. Schäden des Leberparenchyms oder Schwangerschaft (Ovulationshemmer) senken die Normalaktivität der Serumcholinesterase. Andere Erkrankungen, z.B. nephrotisches Syndrom, steigern sie.
3. Auch durch zahlreiche Pharmaka werden die Cholinesterasen mehr oder weniger stark gehemmt: Physostigmin, Prostigmin, Farbstoffe, Vitamine, Hormone (Ovulationshemmer), Narcotica, Hypnotica u.a.
4. Zwar überdauern Cholinesterasen den Tod im Organismus verhältnismäßig lange; trotzdem können reines Serum oder intakte Erythrozyten aus der Leiche nur bei relativ frischem Zustand gewonnen werden.

Zu einem späteren Zeitpunkt ist mit einer Hämolyse der Erythrozyten und einem unkontrollierbaren Austausch des Gewebswassers mit dem Serum zu rechnen, sodaß der Bezug auf Normalwerte fragwürdig wird.

5. Die Hemmung der Cholinesterase durch Alkylphosphate ist in vivo wie in der Leiche und in vitro mehr oder weniger schnell wieder reversibel (Friedberg und Erdmann, 1959)
6. Das Ausmaß der Esterasehemmung ist abhängig von der Giftkonzentration und Art (Friedberg und Erdmann, 1959)
7. In vivo-Untersuchungen über das Verhalten des Fermentes bei Alkylphosphatvergiftungen sind mit der Schwierigkeit belastet, daß im Vergiftungsgeschehen viele Faktoren nebeneinander wirken: Resorptions- und Verteilungsbedingungen, chemische Entgiftung, Ausscheidung und Fermentneubildung, Wirkstoffumbau und viele andere Faktoren überlagern sich (vgl. z.B. W.Schaumann, 1960)
8. Geldmacher-v.Mallinckrodt und Lindorf (1969) sowie Geldmacher-v.Mallinckrodt, Rabast und Lindorf (1969) haben nach Inkubation menschlicher Serumcholinesterase (EC 3.1.1.8) mit E 600 (O,O-Diäthyl,O-(p-nitrophenyl)-phosphat) in bestimmten Konzentrationen individuell unterschiedliche Vergiftungsgrade des Fermentes festgestellt. Bei Messung der Cholinesteraseaktivität der Seren von 75 Personen nach Inkubation mit E 600 in $3,2 \times 10^{-8}$ molarer Konzentration ergab sich unabhängig von der Ausgangsaktivität eine Aufteilung in drei Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Restaktivität. Bei einer E 600-Konzentration von 10^{-7} mol erfolgte eine vollständige Hemmung der Serumcholinesterase in allen drei Gruppen.

II. Enzymatische Spaltung von E 600 im Serum

Zur Deutung dieser Erscheinung liegen zwei Möglichkeiten nahe: Einmal können die Unterschiede durch einen Polymorphismus der Serumcholinesterasen bedingt sein, denn durch Messung der Enzymaktivität vor und nach Inkubation mit bestimmten Hemmstoffen ist bei den Cholinesterasen des menschlichen Serums schon mehrfach eine Zuordnung zu gut definierten Typen erfolgt (zusammenfassende Darstellung siehe Goedde, Doenicke und Altland, 1967). Als zweite Möglichkeit ist ein Polymorphismus eines E 600-spaltenden Serumfermentes in Betracht zu ziehen.

Aldrige (1953, 1953 a) fand als erster im Serum verschiedener Tierarten und des Menschen ein E 600-spaltendes Enzym (Paraoxonase), das nach seinen Untersuchungen mit der sog. A-Esterase (EC 3.1.1.2) identisch ist, die im Gegensatz zu der sog. B-Esterase von Organophosphaten nicht gehemmt wird. Diese Serum-Paraoxonase wurde weiter besonders von Augustinsson und Heimbürger (1954 a, b, 1955), Mounter (1954), Friedberg und Erdmann (1959), Main (1960) sowie Schaumann und Schiller (1960) untersucht. Erdös und Boggs (1961) konnten vorwiegend in der menschlichen Serumfraktion IV-1, aber auch in der Albuminfraktion V Paraoxon-spaltende Fermente mit unterschiedlicher Hemmbarkeit z.B. durch EDTA feststellen.

In neuerer Zeit beschrieben Skrinjarik-Spoljar und Reiner (1968) die fermentative Spaltung von E 600 und Armin (O-Äthyl, O-(p-nitrophenyl)-äthylphosphonat) durch menschliches Serum.

Sie verwandten defibriniertes Blut gesunder Erwachsener beiderlei Geschlechts innerhalb von 24 Stunden nach der Blutentnahme. Als Substrat dienten 7,5 mM E 600 und 7,5 mM Armin, als Puffer 25 mM Tris-HCl (pH 7,0). Die Hydrolyse erfolgte bei 37°C. Das während 15 Minuten freigesetzte p-Nitrophenol wurde als Maß für die Fermentaktivität quantitativ bestimmt.

Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, daß Nativseren wahrscheinlich ein Enzym mit bevorzugter Paraoxonase-Aktivität besitzen, während bei einer Mischung der Serumeiweißfraktionen IV-1 und V die Arminaseaktivität überwiegt.

Auch Krisch hat 1968 gezeigt, daß menschliches Serum E 600 in einer Konzentration von 10^{-4} m fermentativ spaltet. Das pH-Optimum dieser Reaktion liegt im stark alkalischen Bereich bei etwa 11. Bei Untersuchungen an Seren von je 25 Männern und 25 Frauen mit einer E 600-spaltenden Aktivität entsprechend 38 bis 190 μMol p-Nitrophenol/min x Liter Serum konnte er zwei sich überlagernde Gruppen erkennen, die sich durch die Höhe der Esteraseaktivität unterschieden. Dabei schwankte die Aktivität einer Versuchsperson mit niedriger Aktivität über einen Zeitraum von 35 Tagen nur geringfügig, während eine Versuchsperson mit hoher Aktivität (Mittelwert 200 Einheiten) Unterschiede von insgesamt ± 30 Einheiten aufwies.

Krisch hält es für möglich, daß die Aktivitätsunterschiede genetisch bedingt sind. Allerdings gelang es ihm wegen Überlagerung im Einzelfall nicht immer, eine Versuchsperson einer der beiden Gruppen sicher zuzuordnen.

Geldmacher-v.Mallinckrodt und Lindorf (1969) sowie Geldmacher-v.Mallinckrodt, Rabast und Lindorf (1969) hielten es für denkbar, daß während des Ablaufs der Hemmung menschlicher Serumcholinesterase in vitro durch E 600 in geeigneter Konzentration Unterschiede einer Paraoxonase-Aktivität die E 600-Konzentration so variieren, daß unterschiedliche nicht vergiftete Restaktivitäten der Cholinesterase verbleiben (siehe Abbildung 1), wobei die Cholinesterase selbst keinen Polymorphismus aufweist, sondern als empfindliches Indikationssystem für die verbleibende E 600-Konzentration und damit die jeweilige Paraoxonaseaktivität dient.

W. Baumgartner untersuchte bei 50 Probanden mit niedriger, mittlerer und hoher Cholinesterase-Restaktivität in der Versuchsanordnung nach Geldmacher-v.Mallinckrodt und Lindorf parallel die Aktivität des E 600-spaltenden Prinzips im Serum nach Krisch. Die gefundenen Ergebnisse sprechen für die Annahme, daß die nach Vergiftung der Serumcholinesterase mit E 600 ($c = 3,2 \times 10^{-8} \text{ mol}$) verbleibenden unterschiedlichen Cholinesterase-Restaktivitäten mindestens zum Teil durch Unterschiede in der E 600-spaltenden Aktivität des menschlichen Serums bedingt sind, wobei der Korrelationskoeffizient 0,68 beträgt. Personen, die nach Geldmacher-v.Mallinckrodt und Lindorf niedrige Cholinesterase-Restaktivität aufwiesen, besaßen auch im Verfahren nach Krisch eine niedrige E 600-spaltende Aktivität. Personen, die nach Geldmacher-v.Mallinckrodt und Lindorf mittlere Cholinesterase-Restaktivitäten aufwiesen, zeigten nach Krisch mittlere bis hohe E 600-spaltende Aktivität. Das gleiche galt für Personen mit hoher Cholinesterase-Restaktivität.

III. Wirkungsweise, Vergiftung und Reaktivierung der Serumcholinesterasen

Lorke und Kimmerle (1968) stellten das bisher Bekannte über Wirkungsweise, Vergiftung und Reaktivierung der Acetylcholinesterase (AChE) systematisch zusammen. (Man findet die AChE im Nervensystem, den Drüsen und Erythrozyten.) Entsprechendes gilt für die im Blutserum, verschiedenen Geweben und dem Zentralnervensystem vorkommende Pseudocholinesterase (PChE).

Da bei unseren Untersuchungen ausschließlich mit den Cholinesterasen des Blutserums experimentiert wurde, wird in der folgenden Arbeit für Pseudocholinesterase meist der Ausdruck Serumcholinesterase verwendet.

1) Hydrolyse von Acetylcholin durch die Cholinesterasen
(vgl. Abb. 1)

Der anionische Teil der Serumcholinesterase bindet den kationischen Teil des Acetylcholins durch Coulomb'sche Kräfte. Gleichzeitig wird der Kohlenstoff der Estergruppe an die Basis des esteratischen Teils fixiert (I. Stufe).

Durch eine komplizierte Wasserstoffbindung, Umordnen mit Spaltung der Sauerstoff-Kohlenstoff-Bindung entsteht acetyliertes Enzym und Cholin (II. Stufe).

Das acetylierte Enzym wird durch Wasser hydrolysiert, die G-C-Bindung bricht auf, und es bildet sich Essigsäure und das wieder intakte Enzym (III. Stufe).

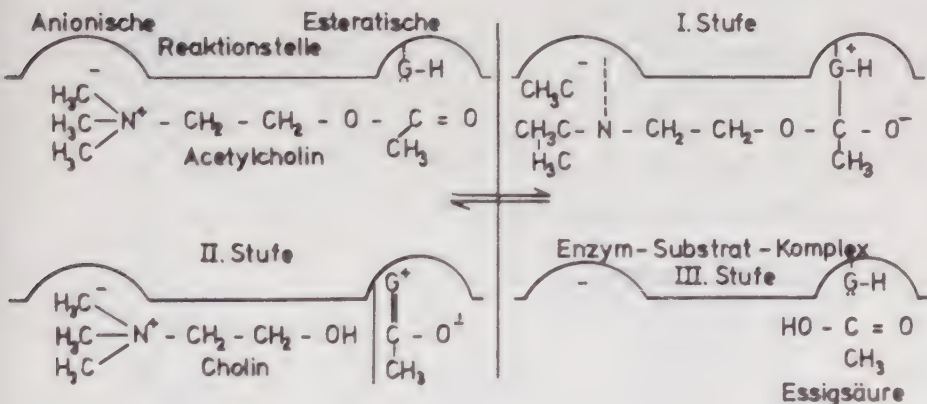


Abb.1: Acetylcholinspaltung durch Acetylcholinesterasen
bzw. Serumcholinesterasen

2) Reaktion mit Phosphorsäureestern

a) Phosphorylierung der Cholinesterase (vgl. Abb.2)

Die Reaktion zwischen Phosphorsäureester und Serumcholinesterase ist eine Reaktion erster Ordnung, wobei die Hemmung proportional der Konzentration des Inhibitors ist und durch Temperaturerhöhung beschleunigt wird. Sie läuft in drei Stufen ab. Zunächst entsteht der Phosphat-Enzym-Komplex, dann das phosphorylierte Enzym, welches schließlich durch das schwach nucleophile Wasser gespalten wird. Dies dauert wesentlich länger als die Hydrolyse des acetylierten Ferments und hängt von der chemischen Struktur des Inhibitors ab. Erfolgt keine Spaltung mehr, ist die Hemmung irreversibel.

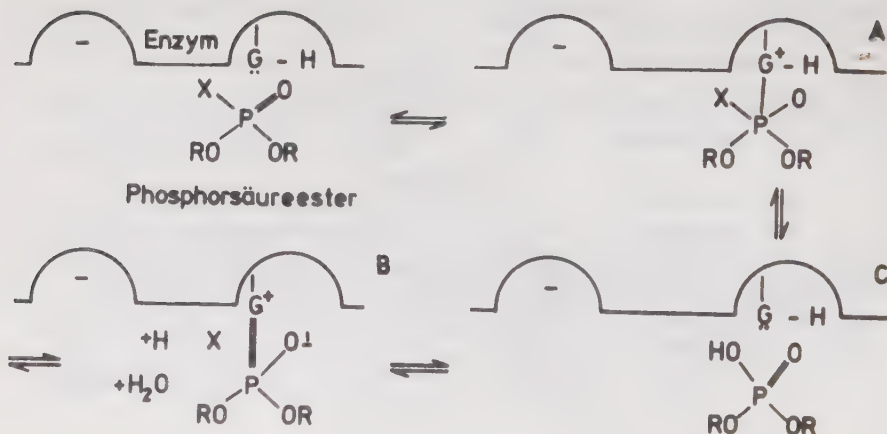


Abb. 2: Phosphorylierung der Serumcholinesterase

b) Spontane Reaktivierung und Alterung (vgl. Abb. 3)

Es ist bekannt, daß die Reaktivierbarkeit des phosphorylierten Fermentes mit der Dauer der Fermentblockade abnimmt. Diesen Vorgang bezeichnet man als **Alterung** oder "ageing".

Hobbing (1955 und 1956) stellt sich vor, daß der Phosphorylrest nach einiger Zeit von seiner primären Haftstelle, von der "esterasischen Reaktionsstelle" in das Innere des Enzymmoleküls wandert: Die Phosphorylgruppe wird vom Imidazolring des Histidins an einem benachbarten Serinrest gebunden. Eine Reaktivierung ist zu diesem Zeitpunkt jedenfalls nicht mehr möglich. Die esterspaltende Aktivität des Enzyms bleibt erloschen.

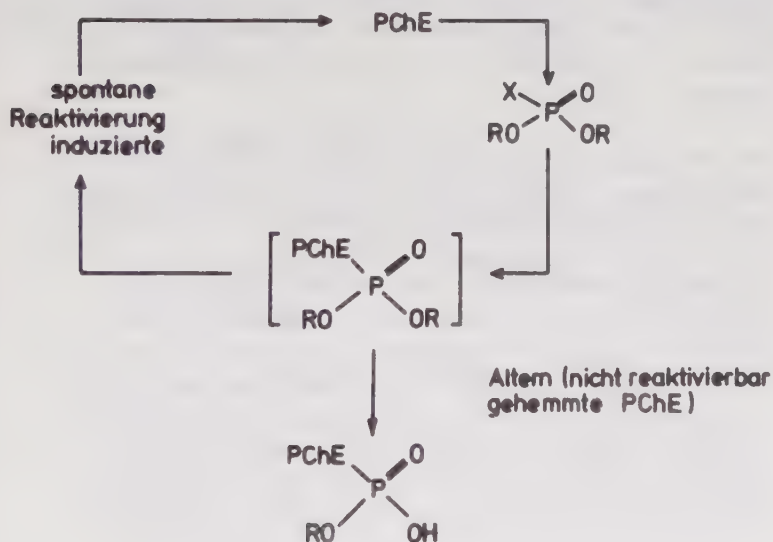
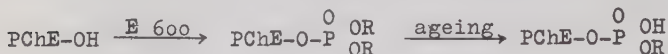


Abb. 3: Alterung der phosphorylierten PChE nach Lorke und Kimmerle (1968)

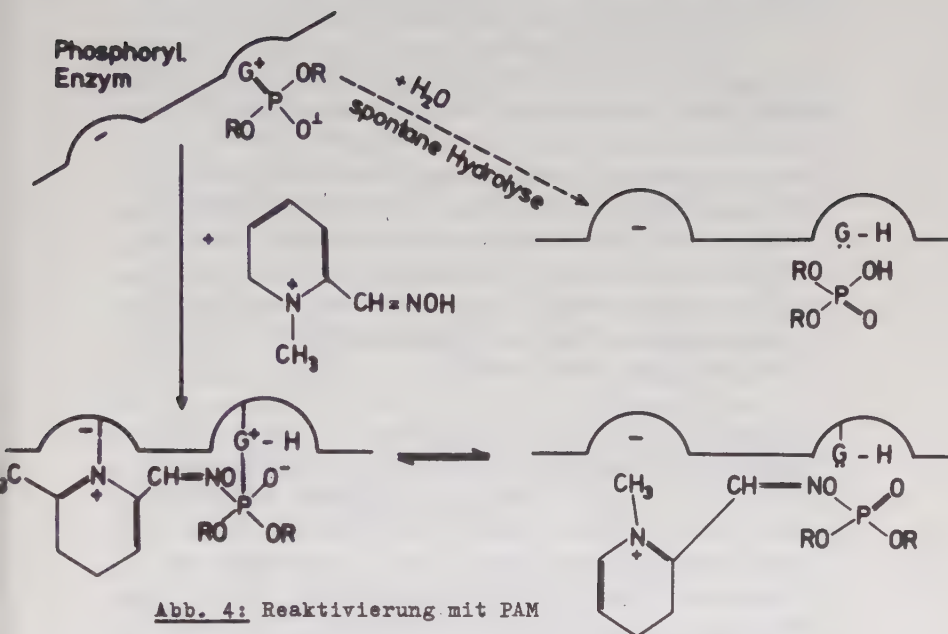
Neue Untersuchungen von Behrens, Posthumus und Mitarbeiter (1959) zeigten, daß die Verminderung der Reaktivierbarkeit wahrscheinlich mit der Abspaltung einer Alkylgruppe durch Hydrolyse aus dem Dialkyl-Phosphoryl-Ferment-Komplex einhergeht $(RO)_2P(O) - AChE + HOH \rightarrow (RO)(OH) - P(O) - AChE + ROH$;



c) induzierte Reaktivierung (vgl. Abb. 4)

Nach der Vorstellung von Wilson und Nachmansohn (1955) müssen "Reaktivatoren" in der Lage sein, den bei der Hydrolyse des Phosphorsäureesters am Ferment verbleibenden Phosphorylrest von diesem wieder abzu-
drängen.

Das von Wilson und Ginsburg gefundene PAM und seine Salze waren die ersten therapeutisch wirksamen Stoffe, die mit Phosphorsäureestern gehemmte Cholinesterasen reaktivierten. Beim Hinzukommen von PAM wird der quarternäre Stickstoff am anionischen Zentrum der PChE fixiert und das Oximolekül ausgerichtet. Der Sauerstoff des durch Doppelbindung auf die esterasische Stelle gerichteten Oximrestes ist nucleophiler als der Phosphor, sodaß dieser an Sauerstoff gebunden und vom Enzym gelöst wird. Der Enzymphosphatkomplex wird erneut gespalten, wobei Hydrogenphosphat (keine PChE-Hemmung) und das aktive Enzym entsteht (Abb. 4).



PAM besitzt nach Lorke und Kimmerle drei Wirkungen:

1. in therapeutischen Dosen reaktiviert es gehemmte AChE und PChE;
2. in hohen Dosen hemmt es AChE und PChE;
3. es reagiert mit Phosphorsäureestern und hydrolysiert das (toxische) Reaktionsprodukt, wobei bei E 600 nur inaktive Stoffe entstehen. Diese direkte Reaktion ist unter physiologischen Bedingungen sehr langsam (Kewitz und Mitarbeiter, 1956) und bei der Antidotwirkung nicht von Bedeutung.

B. Problemstellung

Häufig kann ein Anhalt für eine Vergiftung mit E 605 allein durch den Nachweis der Blockierung der Cholinesterasen, besonders im Serum, gewonnen werden. Da jedoch die Aktivität der normalen Serumcholinesterase erheblich streut und auch durch verschiedene Krankheiten und Pharmaka eine Steigerung oder Senkung der Aktivität möglich ist, sowie eine Hemmung der Serumcholinesterasen durch E 605 teilweise reversibel ist, ist die Deutung einer gemessenen niedrigen oder fehlenden Aktivität sehr erschwert.

Friedberg und Sakai (1958) prüften, ob ein spezifischer Nachweis von Vergiftungen durch Alkylphosphate, vor allem durch E 605, im Blut und Hirngewebe mit Hilfe eines fermentreaktivierenden Antidots möglich und die praktische Anwendung sinnvoll ist. Die Autoren vergifteten u.a. in vitro Hirnhomogenat, Blut und Serum mit E 600 in 3×10^{-6} mol Konzentration. Die vergifteten Fermentpräparate wurden anschließend mit PAM in 5×10^{-3} mol Konzentration reaktiviert.

Die Brauchbarkeit dieses Nachweises für die Praxis zeigten Untersuchungen an 12 Todesfällen, bei denen im Blut und in Gehirnabschnitten die Cholinesteraseaktivität mit und ohne PAM gemessen wurde und eine reversible Hemmung durch PAM nachgewiesen werden konnte.

Friedberg und Erdmann (1959) untersuchten an Pferdeseren die spontane Reaktivierung der durch E 600 blockierten Cholinesterase. Die Spontanreaktivierung

der vergifteten Seren betrug nach Aufbewahrung 50 - 70 %. Die an menschlichen Seren von U. Rabast unter gleichen Bedingungen durchgeführten Untersuchungen ergaben hingegen eine Spontanreaktivierung von 19 - 39 %.

Beobachtungen der zeitlichen Änderung der Spontanreaktivierung an menschlichen Seren konnten zeigen, nach welcher Zeit eine Untersuchung des menschlichen Serums bei einer fraglichen Alkylphosphatvergiftung noch Aussicht auf eine diagnostische Verwertung hat. Durch gleichzeitigen Anstieg der Spontanreaktivierung und Abnahme der Reaktivierbarkeit durch PAM waren bei Aufbewahrung der Seren bei Zimmertemperatur diese Werte schon nach 8 - 14 Tagen gleich, wogegen bei Kühlschrankaufbewahrung eine in vitro-Vergiftung noch bis nach 42 - 62 Tagen nachzuweisen war.

Bei mehreren tödlichen E 605-Vergiftungsfällen, bei denen noch körperwarmes Blut abgenommen worden war, lag die Reaktivierbarkeit durch PAM entschieden unter den bei Raumtemperatur untersuchten Seren. Dieser Umstand ließ einen maßgeblichen Einfluß der Körpertemperatur auf die Abnahme der Reaktivierbarkeit durch PAM vermuten.

Wir möchten in weiteren Versuchen das Verhalten der un- vergifteten, vergifteten, sowie der vergifteten und mit PAM reaktivierten menschlichen Serumcholinesterasen untersuchen und deren Normalaktivität, die Zunahme der Spontanreaktivierung und die Abnahme der Reaktivierbarkeit bei 37°C nach unterschiedlichen Lagerungszeiten beobachten und vergleichen mit Seren, die unter gleichen Bedingungen bei 5°C aufbewahrt wurden.

Zur Vergiftung verwendeten wir E 600 in 3×10^{-6} mol Konzentration. Es wird angegeben, daß diese Konzentration so hoch ist, daß sie in vivo praktisch nicht vorkommt (Friedberg und Sakai, 1958). E 605 ist für in vitro-Versuche nicht brauchbar, da es erst durch Konversion in E 600 umgewandelt werden muß.

Als Fermentpräparate verwendeten wir ausschließlich menschliche Seren von 20 Versuchspersonen (12♂, 8♀), die aus frisch entnommenem Blut hergestellt wurden. Nach Bestimmung der Normalaktivität wurde ein Teil der Serumprobe vergiftet und zusammen mit dem entsprechenden unvergifteten Serumanteil im Wasserbad bei 37°C und im Kühlschrank bei 5°C aufbewahrt.

Da das fermentreaktivierende Antidot PAM in Konzentrationen über 3×10^{-3} mol hemmend auf die Serumcholinesterase wirkt (Friedberg und Sakai, 1958), wurde in weiteren Versuchen auch das Verhalten der Reaktivierbarkeit der in vitro mit E 600 in 3×10^{-6} mol Konzentration vergifteten Serumcholinesterase bei geringeren PAM-Konzentrationen untersucht.

Geldmacher-v.Mallinckrodt und Lindorf (1969) und Geldmacher-v.Mallinckrodt, Rabast und Lindorf (1969) beobachteten, daß sich nach Inkubation menschlicher Serumcholinesterase mit E 600 in bestimmten Konzentrationen unterschiedliche Vergiftungsgrade des Fermentes ergeben, wofür die Autoren Unterschiede in der Aktivität eines E 600-spaltenden Fermentes, auch Paraoxonase genannt, annehmen, die während des Ablaufs der Cholinesterase-Hemmung die E 600-Konzentration so variieren, daß unterschiedliche Restaktivitäten verbleiben.

Diese Beobachtung veranlaßte uns zu prüfen, ob in einer "Grenzsituation" bei einer hohen Para-oxonase-Aktivität eine reversible Hemmung durch eine bestimmte PAM-Konzentration noch zu erkennen ist, während dies bei niedriger Paraoxonase-Aktivität unter sonst gleichen Bedingungen nicht mehr möglich ist.

C. Eigene Untersuchungen

I. Einfluß von Temperatur und Zeit auf Aktivität und Reaktivierbarkeit durch PAM der mit E 600 vergifteten Serumcholinesterase

1) Experimentelle Bedingungen

a) Gewinnung und Aufteilung des Serums

Gesunden, nicht miteinander verwandten Versuchspersonen wurden jeweils 60 ml Blut entnommen, das spätestens nach einer halben Stunde bei 3000 g 20 min. lang zentrifugiert wurde, wobei das überstehende Serum nicht hämolytisch werden durfte. Das Serum wurde mit einer Rekordspritze abgesaugt und in sechs Portionen in Reagenzgläsern wie folgt verteilt:

3 x 1,8 ml für die Aufbewahrung bei 5°C und

3 x 1,8 ml für die Aufbewahrung bei 37°C.

Von diesen beiden Reihen enthielt jeweils ein Reagenzglas normales und die beiden anderen mit E 600 vergiftetes Serum.

Bei allen Seren machten wir die erste Messung ungefähr zwei bis drei Stunden nach Serumgewinnung. In einem Untersuchungsgang wurde immer gleichzeitig normales, vergiftetes, vergiftetes und mit PAM reaktiviertes Serum untersucht.

b) Herstellung der unvergifteten Serumansätze

Ungefähr zwei bis drei Stunden nach Blutentnahme wurde zur Durchführung der ersten Messung zu 0,15 ml unvergiftetem Serum 1,35 ml Verdünnungslösung gegeben. Die Verdünnungslösung war eine Mischung aus 10 Teilen einer 0,9 %igen NaCl-Lösung und drei Teilen einer 1,26 %igen NaHCO_3 -Lösung und wurde alle 14 Tage neu hergestellt. Vor Gebrauch wurde sie mit einem Gasgemisch von 5 % CO_2 und 95 % N_2 durchströmt.

Von diesem Versuchsansatz wurden je 0,5 ml in die Anhangsbirnen zweier Warburg-Kölbchen pipettiert und der unten beschriebene Versuch durchgeführt. Die unvergifteten Seren wurden von nun an teils im Wasserbad bei 37°C , teils im Kühlschrank bei 5°C aufbewahrt. Die gemessenen Werte der unvergifteten Seren sind die Normalaktivitäten.

c) Methodik der Vergiftung

Ungefähr zwei bis drei Stunden nach Blutabnahme wurde ein Teil des Serums vergiftet. Hierzu verwendeten wir den Phosphorsäureester O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)phosphat = Paraoxon = E 600.

1 μ l E 600 (Reinsubstanz) wurde nun mit 10 ml Verdünnungslösung versetzt. Diese Lösung ist $4,6 \times 10^{-4}$ molar. Hiermit wurden die Seren vergiftet, indem jeweils 12 μ l der E 600-Lösung in 1,8 ml Serum einpipettiert wurden. Somit kamen zu 0,15 ml unverdünntem Serum 1 μ l Giftlösung. Das entsprach einer $3,0 \times 10^{-6}$ molaren Giftkonzentration. Vor jedem Versuch wurde das Serum 1 : 10 verdünnt, so daß die endgültige Giftkonzentration in den Serumansätzen 3×10^{-7} betrug. Die Inkubationszeit des Giftes beim ersten Versuch betrug bis zur ersten Messung 1 1/2 bis 2 Stunden. Von Beginn des ersten Versuches an wurden die vergifteten Seren bei 37°C bzw. 5°C aufbewahrt. Wir entnahmen den Serumgläsern einer Versuchsperson je 0,15 ml und mischten diese mit 1,35 ml Verdünnungslösung. Von jedem dieser Versuchsansätze mit 1,5 ml pipettierten wir 0,5 ml in die Anhangsbirne von zwei Kölbchen und bestimmten die Cholinesteraseaktivität. Das Serum einer Versuchsperson wurde über 8 Tage verfolgt, wobei die im Wasserbad bei 37°C aufbewahrten unvergifteten und vergifteten Seren täglich kontrolliert wurden. Die entsprechenden Kühlschrankseren, die nur zum Vergleich mitliefen, wurden hingegen alle zwei Tage getestet.

d) Methodik der Reaktivierung der mit E 600 vergifteten Seren durch PAM

Zur Reaktivierung wurde Pyridin-2-Aldoxim-N-Methyljodid = PAM benutzt. Die dazu verwendete Lösung von PAM war 10^{-1} molar und wurde für jeden Versuch frisch hergestellt, indem 8 mg Reinsubstanz in 0,3 ml Verdünnungslösung gelöst wurde.

Der Versuchsansatz bestand jeweils aus 0,15 ml vergiftetem Serum, 1,275 ml Verdünnungslösung und 0,075 ml PAM-Lösung. Die bei allen Versuchen übliche 1 : 10 Verdünnung des Serums blieb zunächst bestehen. Von diesen Versuchsansätzen wurden je 0,5 ml in die Anhangsbirne der Warburg-Kölbchen pipettiert und der Versuch durchgeführt. Die Endkonzentration von PAM im verdünnten Serum war 5×10^{-3} molar. Trotz dieser hohen Konzentration bleibt die hemmende Wirkung von PAM auf die Pseudocholinesterase gering, da die Acetylcholin-Konzentration hoch war (von Friedberg und Sakai für 10^{-3} mol PAM-Konzentration beschrieben). Die Inkubationszeit von PAM bis zur ersten Messung betrug etwa 1 Stunde 10 Minuten. Die bei 37°C im Wasserbad aufbewahrten Seren wurden über 8 Tage 24-stündlich untersucht. Die bei 5°C aufbewahrten Seren wurden über den gleichen Zeitraum beobachtet, jedoch wurden hier Messungen im Abstand von 48 Stunden durchgeführt.

e) Durchführung des Versuchs

Die Cholinesteraseaktivität bestimmten wir in einer Warburgapparatur Typ V 85 der Firma Braun, Melsungen, mit der manometrischen Methode von Ammon (1934) in der Modifikation von Friedberg und Sakai (1958), jedoch bei einem pH-Wert von 7,2.

Für jeden Versuch standen 14 Manometer zur Verfügung. Von jedem Serumansatz wurden zwei Tröge beschickt und somit Doppelmessungen durchgeführt. Zur Kontrolle liefen je Versuch zwei Leerwerte mit, bei denen die Anhangsbirne nur Verdünnungslösung enthielt, wodurch

die Eigenhydrolyse des Acetylcholinchlorids erfaßt wurde.

Somit konnten in einem Versuchsablauf 6 verschiedene Serumansätze geprüft werden. Diese waren unvergiftet, mit E 600 in 3×10^{-6} mol Konzentration vergiftet sowie vergiftet und kurz vor Versuchsbeginn mit PAM wieder reaktiviert worden. Die Serumansätze stammten jeweils aus der Reihe der Seren, die bei 5°C und bei 37°C aufbewahrt wurden.

Von jedem Ansatz wurden 0,5 ml des mit Verdünnungslösung 1 : 10 verdünnten Serums in die Anhangsbirne des Warburggefäßes gegeben, das im Hauptraum 1,5 ml einer 0,5 %igen wässrigen Lösung von Acetylcholinchlorid enthielt. Die Acetylcholinchloridlösung wurde nach drei Tagen wegen der zunehmenden Eigenhydrolyse frisch angesetzt. Die Kölbchen wurden nach Einfetten der Glasschliffe an den Manometern befestigt und in das Wasserbad des Warburgapparates von 37°C gebracht. Sodann wurden alle Manometer mit einem Gasgemisch aus 5 % CO₂ und 95 % N₂ durchströmt und 20 min. geschüttelt (Schüttelfrequenz 100/min.).

Um einen Temperatenausgleich der begasten Flüssigkeiten zu erzielen, warteten wir nach der Begasung 5 min., wobei das Gerät nicht schüttelte. Serum und Acetylcholinchlorid wurden nun durch Kippen gemischt, 3 min. geschüttelt und anschließend das System geschlossen. Der Manometerstand wurde sodann eine Stunde lang alle 15 min. abgelesen. Die Angabe der Aktivität erfolgte in μ l CO₂ pro Stunde, bezogen auf 0,05 ml Serum.

f) Auswertung der Versuchsergebnisse

Es wurde streng darauf geachtet, daß der Anstieg der Manometersäule linear erfolgte. Wurde diese Forderung erfüllt, wurden die 60-min.-Werte mit den jeweils entsprechenden Manometerkonstanten (Berechnung der Konstanten bei Süllmann, 1964) multipliziert. Ebenso wurde der Leerwert errechnet. Sodann wurde das arithmetische Mittel zueinandergehörender Wertepaare gebildet und der Leerwert von der Fermentmessung abgezogen. Die Dimension des mittleren 60-min.-Wertes ist $\mu\text{l CO}_2$.

2) Ergebnisse der Untersuchungen der unvergifteten, der mit E 600 vergifteten und der mit E 600 vergifteten und mit PAM reaktivierten Serumcholinesterasen unter Berücksichtigung von Temperatur und Zeit

Es sei nochmals darauf verwiesen, daß bei jedem Versuch sowohl Normalserum als auch vergiftetes Serum, das bei 5°C bzw. 37°C gleich lang aufbewahrt worden war, sowie eine Probe der vergifteten und mit PAM reaktivierten Seren untersucht und die dazugehörigen Arbeitsgänge parallel durchgeführt wurden.

a) Die Änderung der Normalaktivität nach Aufbewahrung der Seren über 8 Tage bei 5°C im Kühlschrank und bei 37°C im Wasserbad (siehe Tabelle 1 und Abb.5 - 8)

Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, unterscheiden sich die Werte der ersten Messung von denen der letzten Messung. Bei den bei 5°C gelagerten Seren ist die Abweichung der Endaktivität von der Anfangsaktivität

Tabelle 1

Anderung der Normalaktivität nach Aufbewahrung der Seren über 8 Tage bei 5 °C im Kühlschrank und bei 37 °C im Wasserbad

Serum Nr	Geschlecht	Normalaktivität µl CO ₂ /h	Endaktivität nach Aufbewahrung über 8 Tage bei 5 °C µl CO ₂ /h	Differenz zur Anfangsaktivität µl CO ₂ /h	%uale Abweichung von der Anfangsaktivität nach 8 Tagen bei 5 °C	Endaktivität nach Aufbewahrung über 8 Tage bei 37 °C µl CO ₂ /h	Differenz zur Anfangsaktivität µl CO ₂ /h	%uale Abweichung von der Anfangsaktivität nach 8 Tagen bei 37 °C
1	♀	170	174	+ 4	+ 2,4	130	40	23,6
2	♀	229	208	- 21	- 9,2	191	38	16,6
3	♀	240	227	- 13	- 5,4	180	60	25
4	♀	121	130	+ 9	+ 7,4	85	36	29,8
5	♀	153	142	- 11	- 7,2	110	43	28
6	♀	168	158	- 10	- 6,0	125	43	15,8
7	♀	181	172	- 9	- 5	134	47	26,0
8	♀	195	199	+ 4	+ 2,1	142	51	27,2
9	♀	178	162	- 16	- 9	135	43	24,2
10	♀	225	201	- 15	- 7	180	45	16
11	♀	210	215	+ 5	+ 2,4	162	48	29,7
12	♀	207	191	- 16	- 5,9	159	48	23,2
13	♀	216	217	- 8	- 3,6	140	56	26,0
14	♀	280	268	- 12	- 4,3	230	50	17,9
15	♀	194	199	+ 5	+ 2,6	154	40	26
16	♀	177	164	- 13	- 7,3	129	48	27
17	♀	163	172	+ 9	+ 5,5	118	45	27,6
18	♀	191	194	+ 3	+ 1,57	151	40	21,0
19	♀	201	188	- 13	- 6,2	157	44	22,4
20	♀	184	192	+ 8	+ 4,4	133	51	27,7

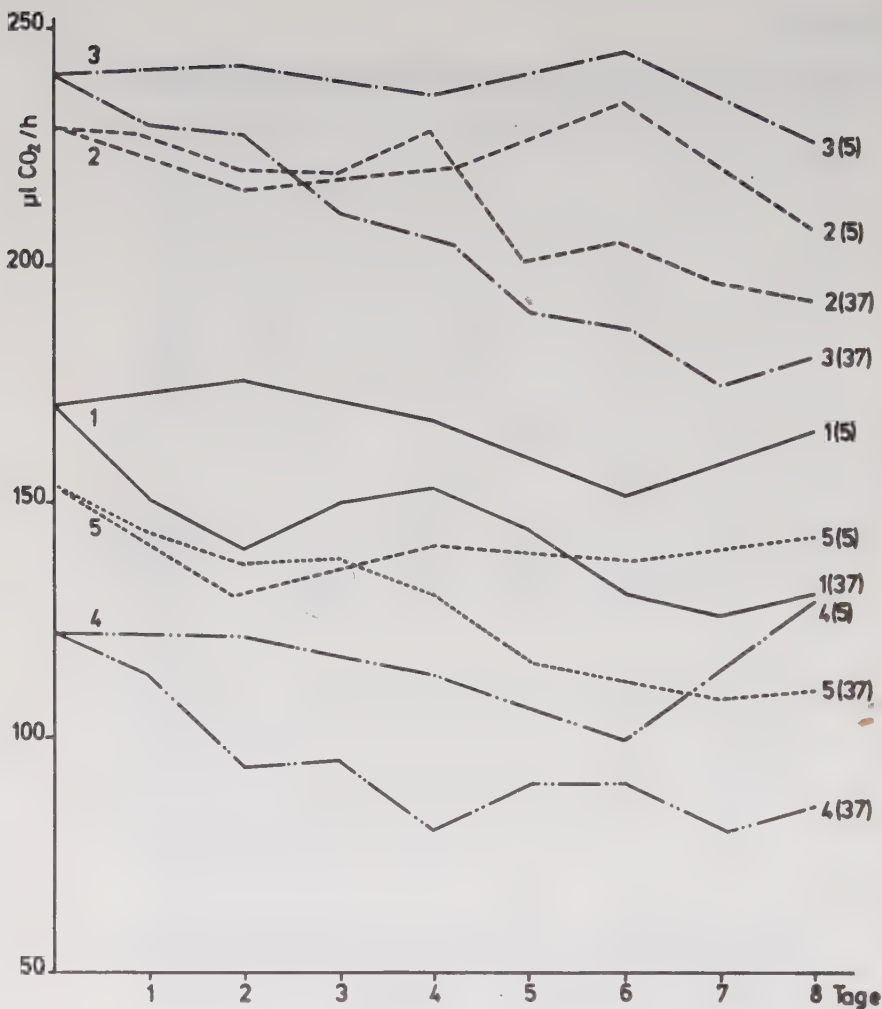


Abb. 5: Serum Nr. 1 - 5 Änderung der Normalaktivität nach Aufbewahrung der Seren über 8 Tage bei 37°C bzw. bei 5°C. Die untere Kurve des jeweiligen Kurvenpaares zeigt den Aktivitätsabfall der bei 37°C aufbewahrten Seren.

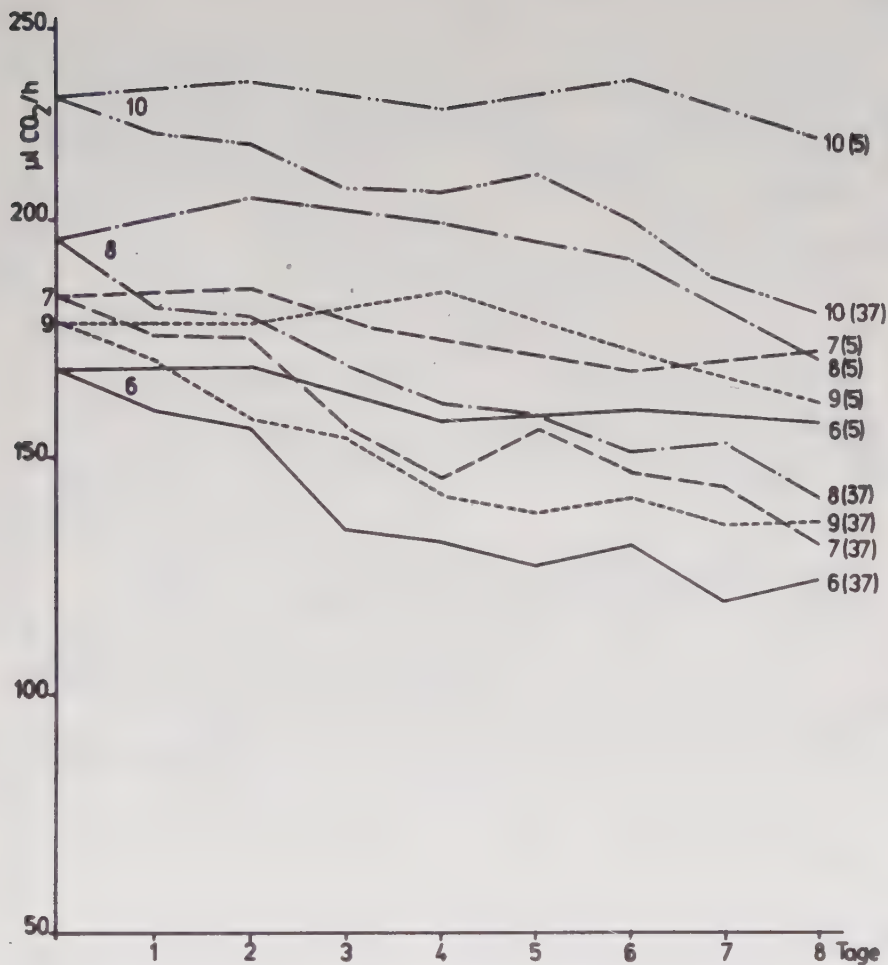


Abb. 6: Serum Nr. 6 - 10 Änderung der Normalaktivität nach Aufbewahrung der Seren über 8 Tage bei 5°C bzw. bei 37°C. Die untere Kurve des jeweiligen Kurvenpaares zeigt den Aktivitätsabfall der bei 37°C aufbewahrten Seren.

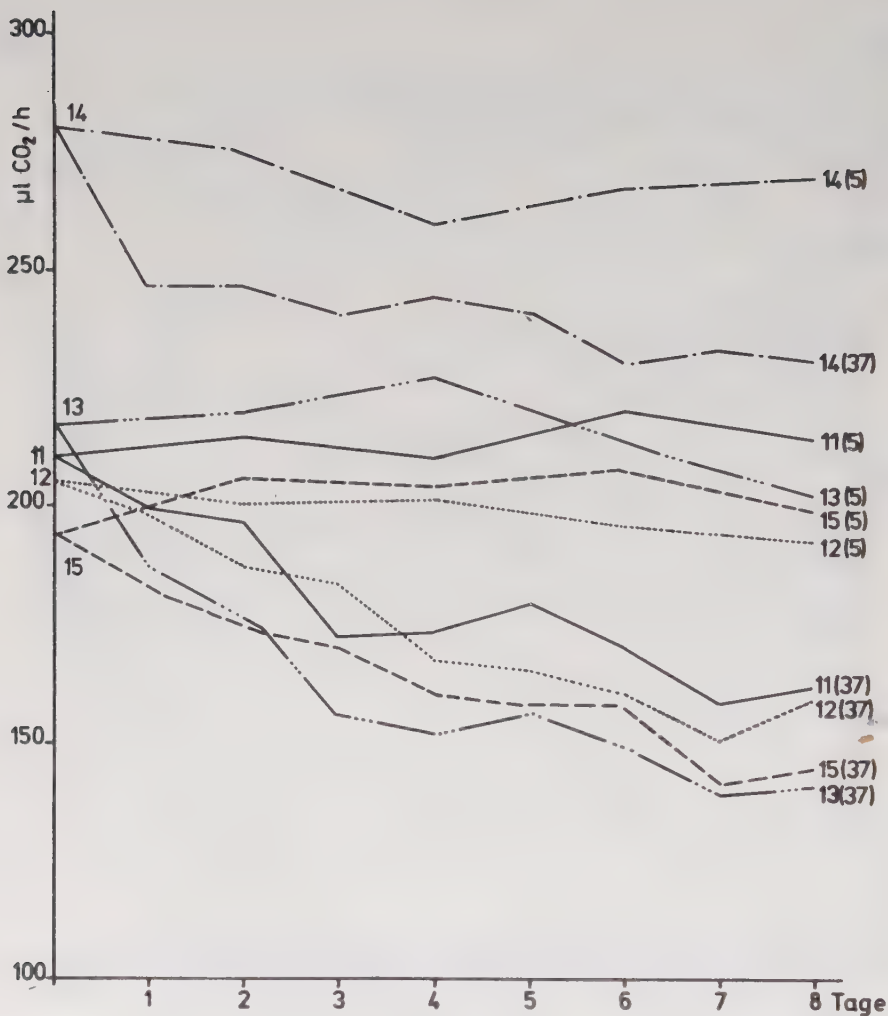


Abb. 7: Seren Nr. 11 - 15 Änderung der Normalaktivität nach Aufbewahrung der Seren über 8 Tage bei 5°C bzw. bei 37°C. Die untere Kurve des jeweiligen Kurvenpaares zeigt den Aktivitätsabfall der bei 37°C aufbewahrten Seren.

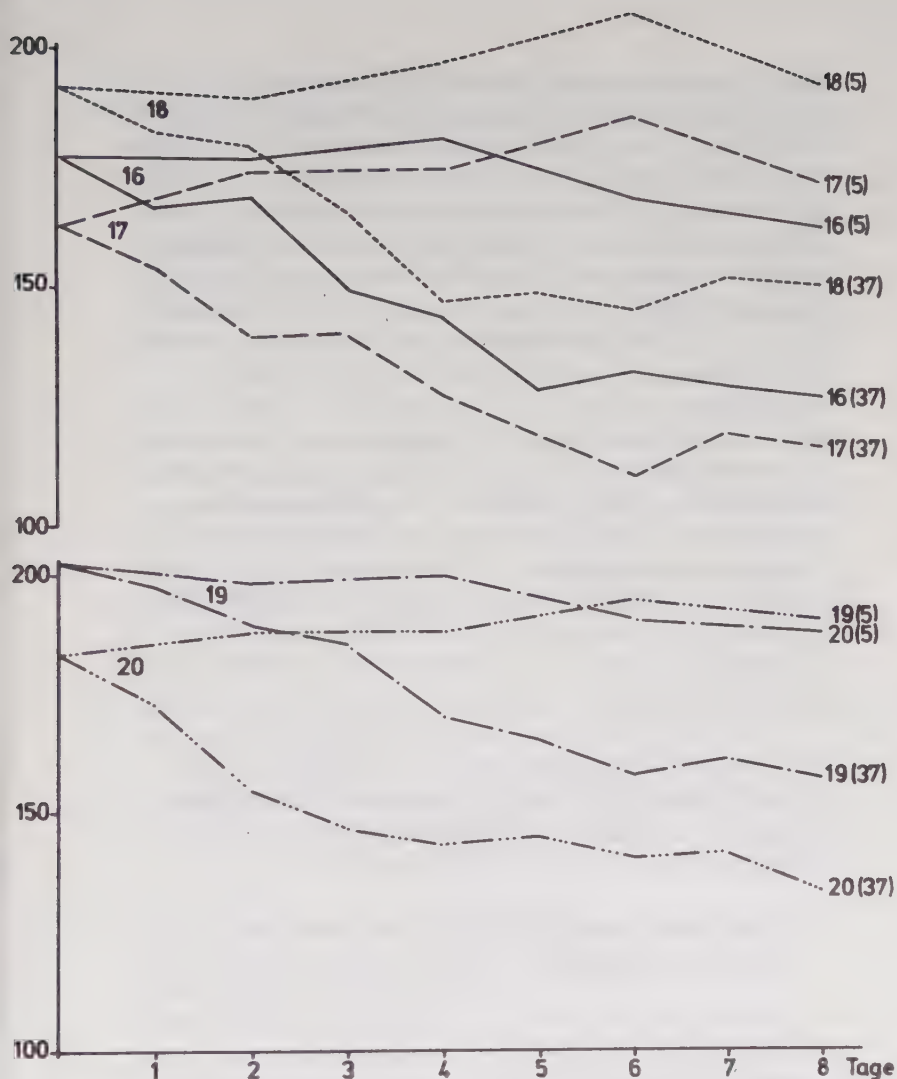


Abb. 8: Seren Nr. 16 - 20 Änderung der Normalaktivität nach Aufbewahrung der Seren über 8 Tage bei 5°C bzw. bei 37°C. Die untere Kurve des jeweiligen Kurvenpaares zeigt den Aktivitätsabfall der bei 37°C aufbewahrten Seren.

gering, verglichen mit der Aktivitätsabnahme der bei 37°C aufbewahrten Seren. 8 Seren zeigten sogar eine zwischen 1,6 und 7,4 % (durchschnittlich 3,5 %) höhere Aktivität als bei der ersten Messung, was durch Messungenauigkeiten der Apparatur in hohen Bereichen und anderen Fehlerquellen (siehe Dissertation U. Rabast) zu erklären ist. Die restlichen Seren haben einen Aktivitätsabfall zwischen 3,6 und 9,2 % (durchschnittlich 6,2 %). Der durchschnittliche Aktivitätsverlust bei Aufbewahrung der Seren bei 5°C über 8 Tage beträgt 2,6 %.

Für die im Wasserbad bei 37°C über 8 Tage aufbewahrten Seren beträgt die größte Differenz zur Anfangsaktivität 60 µl CO₂ (Serum Nr. 3), die geringste Differenz 36 µl CO₂ (Serum Nr. 4). Die größte prozentuale Abweichung von der Ausgangsaktivität finden wir bei den Seren Nr. 20 mit 27,7 %. Der durchschnittliche Aktivitätsverlust bei Aufbewahrung der Seren in einem Wasserbad von 37°C über 8 Tage beträgt 24,1 %.

- b) Die Spontanreaktivierung der mit E 600 ($c = 3,2 \times 10^{-6}$ mol) vergifteten Seren während der Aufbewahrung über 8 Tage bei 5°C im Kühlschrank und bei 37°C im Wasserbad (vgl. Tabelle 2 und Abb. 9 - 12)

- α) Versuchsergebnisse der vergifteten und bei 5°C aufbewahrten Seren (vgl. Tabelle 2 und Abb. 9 - 12)

Bereits nach der zweiten Messung (48 Stunden nach Vergiftung) nahm die Aktivität der Seren zu. Diesen Vorgang bezeichnet man als Spontanreaktivierung.

Die untere flache Kurvenschar der Abbildungen 5 - 9 zeigt den Verlauf der Spontanreaktivierung für die Seren Nr. 1 bis 20. Alle Seren waren bei der ersten Messung praktisch total vergiftet und zeigten keine Reaktivität der Serumcholinesterase mehr, wobei eine Restaktivität von 8 μ l CO_2 /Std. bei den Seren Nr. 12, 11, 14 (Abb. 11) und 10 (Abb. 12), die keine 5 % der Normalaktivität ausmachen, noch innerhalb der Fehlerbreite der Untersuchungsmethode liegen.

Nach 8 Tagen Aufbewahrung im Kühlschrank zeigten 17 Seren noch einen steigenden Verlauf der Spontanreaktivierungskurve. Serum Nr. 5, 14 und 19 hatten bei Abbruch der Messungen anscheinend ihr Maximum bereits erreicht. Dies stimmt mit Beobachtungen von U. Rabast überein, der angibt, daß eine Spontanreaktivierung unter diesen Bedingungen nach 8 - 13 Tagen beendet sei.

(B) Versuchsergebnisse der vergifteten und bei 37 °C aufbewahrten Seren (vgl. Tabelle 2 und Abb. 9 - 12)

Die obere steile Kurvenschar der Abb. 9 bis 12 zeigt den Verlauf der Spontanreaktivierung für die Seren Nr. 1 - 20, jedoch bei 37°C.

Da die erste Messung für beide Versuchsreihen gleich war, gilt auch hier das oben Gesagte über die von 0 abweichende Anfangsaktivität.

Bereits nach 24 Stunden zeigen alle Seren eine Spontanreaktivierung von über 50 % der maximalen Spontanreaktivierung. Serum Nr. 3, 1, 9, 14 sind bei der zweiten Messung sogar über 75 % spontanreaktiviert.

Serum Nr. 14 und 19 hatten nach 3 Tagen ihre maximale Spontanreaktivität erreicht. Bei Serum Nr. 1, 2, 12, 16 dagegen stieg die Spontanreaktivität bis zum 7. Tage nach der Vergiftung. Durchschnittlich war die Spontanreaktivierung bei 37°C mit 23 % der Normalaktivität nach 5,6 Tagen beendet. Die höchste Spontanreaktivierungsrate von 31 % der Normalaktivität zeigt Serum Nr. 12, das mit 207 μ l CO₂/Std. Normalaktivität nur wenig über der durchschnittlichen Normalaktivität der getesteten Seren liegt. Anscheinend besteht zwischen der Höhe der Normalaktivität und der Spontanreaktivierungsrate kein Zusammenhang. Die niedrigste Spontanreaktivierungsrate ergab Serum Nr. 14 mit 15,2 %, obwohl dieses Serum die höchste Normalaktivität hatte.

Zwischen Höhe der Normalaktivität und Tag der maximalen Spontanreaktivität ließ sich kein Zusammenhang finden. So war Serum Nr. 14 mit einer Normalaktivität von 280 μ l CO₂/Std. bereits nach 3 Tagen maximal spontanreaktiviert, während Serum Nr. 1 erst nach 7 Tagen die höchste Spontanreaktivität zeigte. Ebenfalls ließ sich keine Abhängigkeit zwischen Spontanreaktivierungsrate und Tag der maximalen Spontanreaktivierung finden. Z.B. hatte Serum Nr. 2 erst am 7. Tag eine Spontanreaktivität von 17 % erreicht, während Serum Nr. 19 bereits am 3. Tag bis auf 21,8 % maximal spontanreaktiviert war.

8) Vergleich der Versuchsergebnisse der bei 37°C und 5°C aufbewahrten Seren

Die Spontanreaktivierung der vergifteten Seren verläuft bei 37°C wesentlich schneller. Abb. 9 zeigt,

Tabelle II

Maximale Spontanreaktivierung nach Vergiftung mit E 600 in 3×10^{-6} molarer Konzentration bei Aufbewahrung der Seren bei 37 °C im Wasserbad

Serum Nr	Geschlecht	Normalaktivität µl CO ₂ /h	maximale Spontan- reaktivierung µl CO ₂ /h	Tag der maximalen Spontanreaktivierung	maximale Spontan- reaktivierung in % der Normalaktivität
1	♂	170	47,5	7	28
2	♂	229	39	7	17
3	♂	240	48	5	20
4	♂	121	36	6	29,7
5	♀	153	42,5	6	27,8
6	♀	168	49	5	29
7	♂	181	36	8	19,9
8	♀	195	30	6	15,4
9	♀	178	43	4	24,4
10	♂	225	47,5	5	21,3
11	♂	210	48	5	22,8
12	♀	207	65	7	31
13	♂	210	46,5	6	21,3
14	♀	280	42,5	3	15,2
15	♀	194	50	5	25,4
16	♀	177	43	7	24,2
17	♀	163	31	6	19
18	♂	91	52	5	17,2
19	♂	102	44	3	21,8
20	♀	184	35	5	19

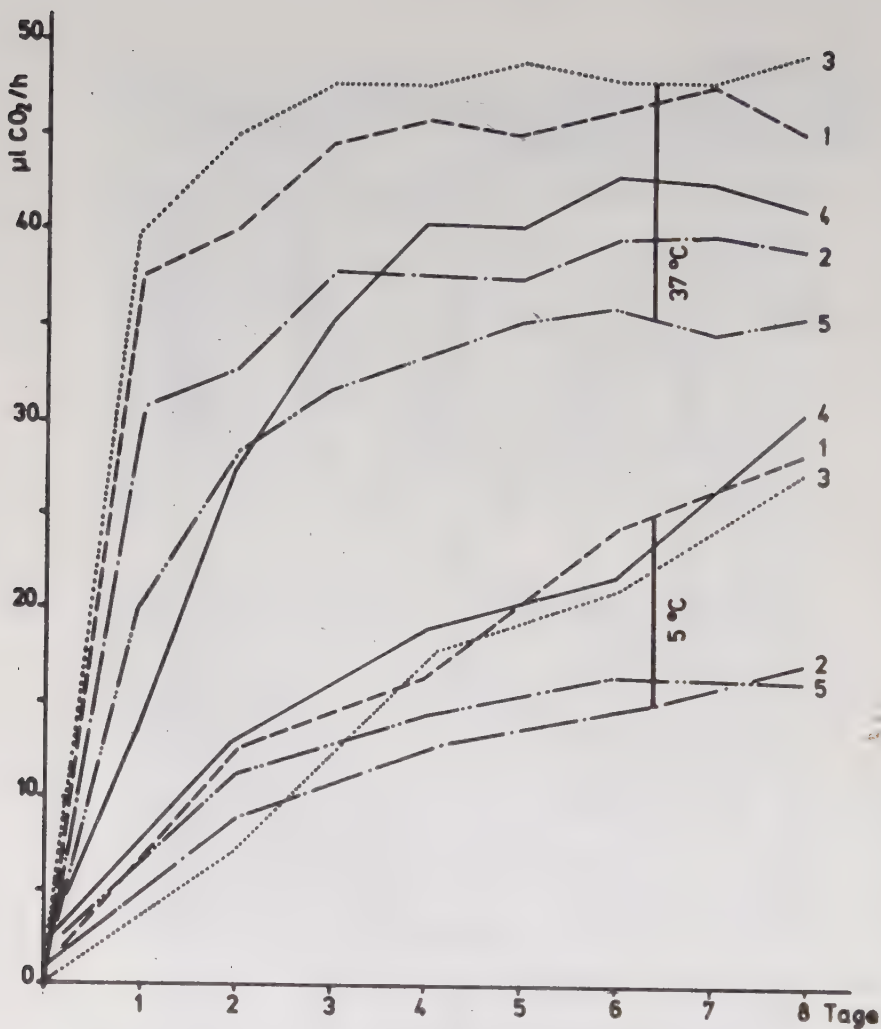


Abb. 9: Seren Nr. 1 - 5 Zunahme der Spontanreaktivierung bei Aufbewahrung über 8 Tage bei 5°C (untere Kurvenschar) bzw. 37°C (obere Kurvenschar).

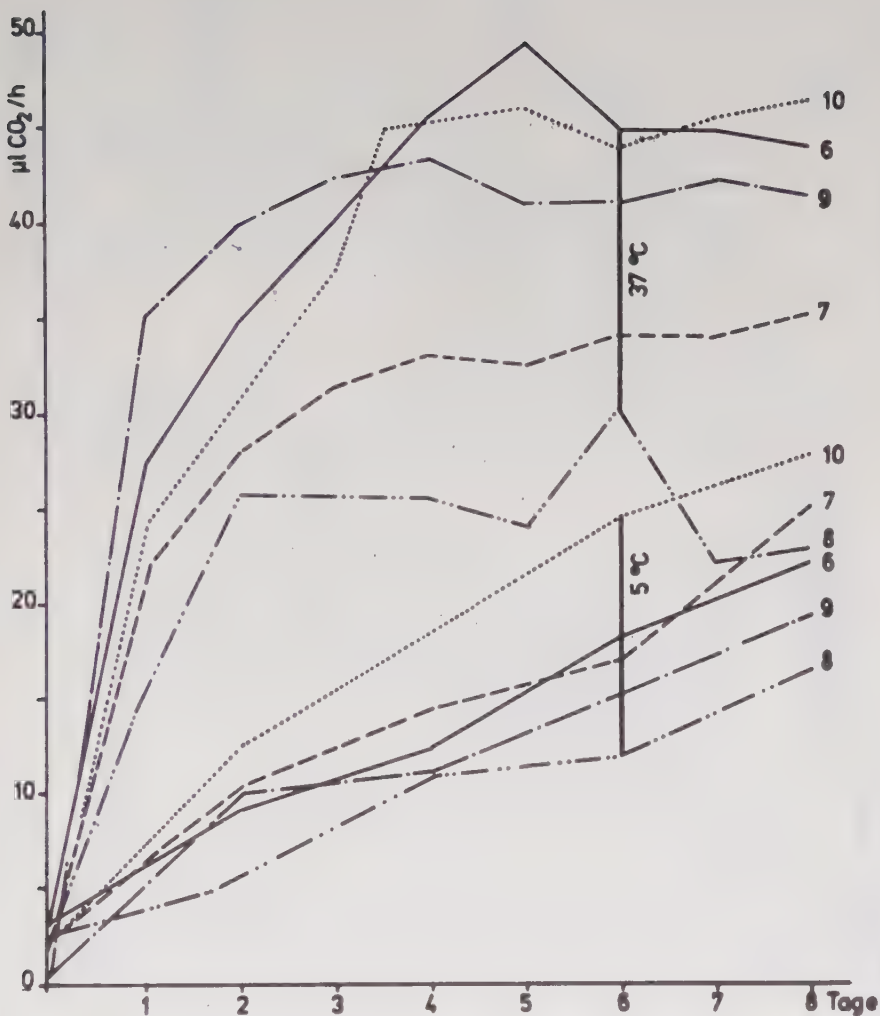


Abb. 10: Seren Nr. 6 - 10 Zunahme der Spontanreaktivierung bei Aufbewahrung über 8 Tage bei 5°C (untere Kurvenschar) bzw. 37°C (obere Kurvenschar).

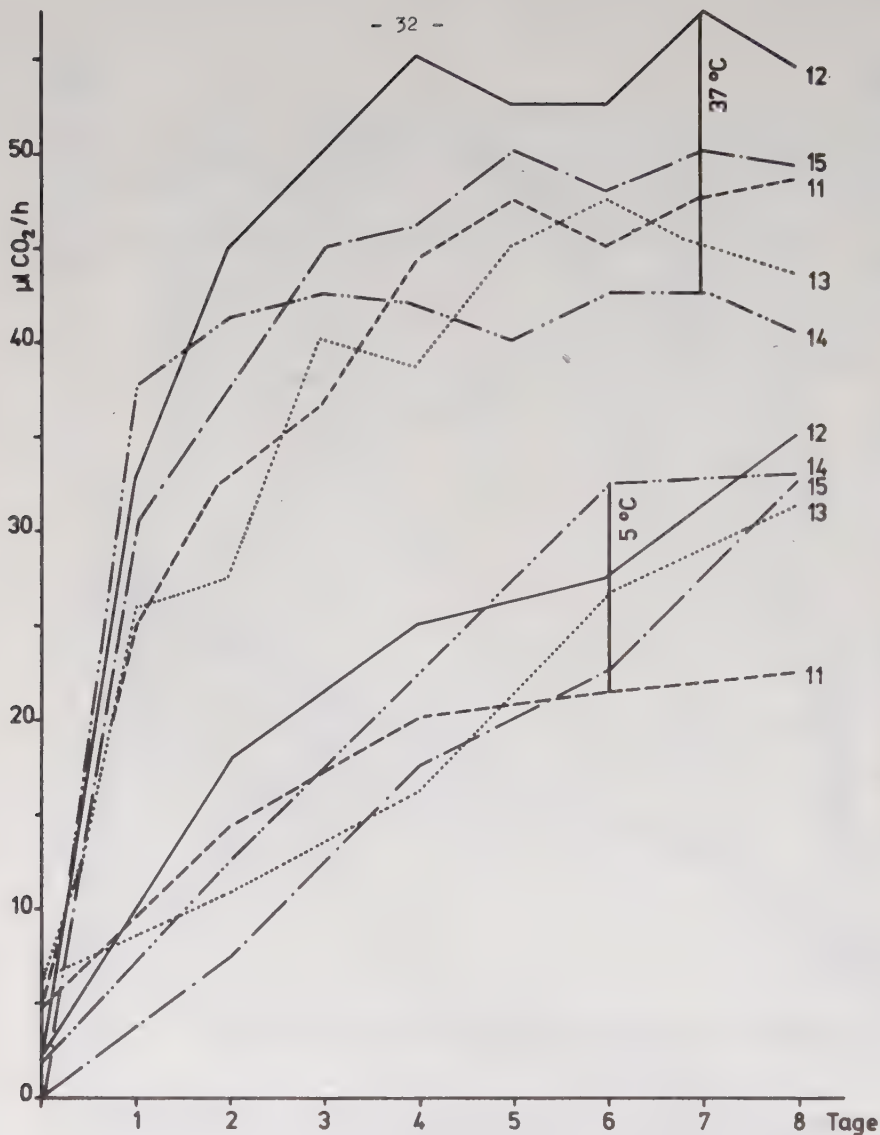


Abb. 11: Seren Nr. 11 - 15 Zunahme der Spontanreaktivierung bei Aufbewahrung über 8 Tage bei 5°C (untere Kurvenschar) bzw. 37°C (obere Kurvenschar).

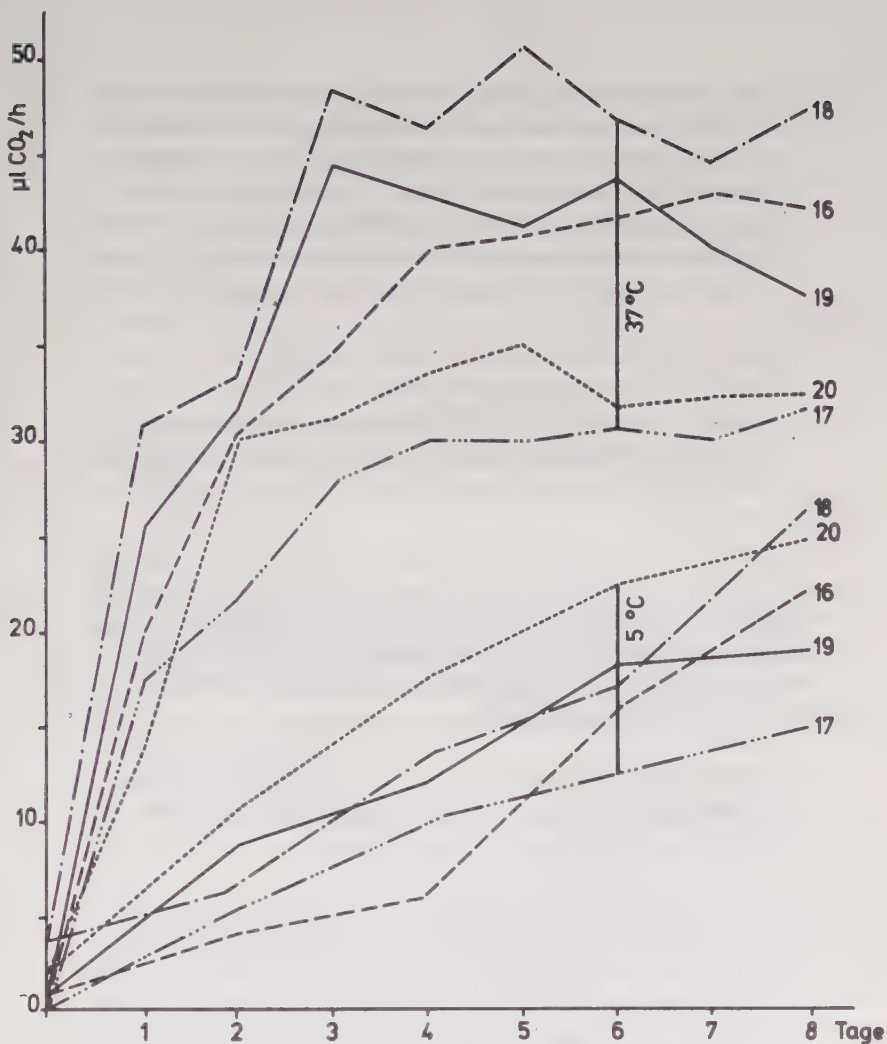


Abb. 12: Seren Nr. 16 - 20 Zunahme der Spontanreaktivierung bei Aufbewahrung über 8 Tage bei 5°C (untere Kurvenschar) bzw. 37°C (obere Kurvenschar).

daß die Kurvenschar der bei 37°C aufbewahrten Seren bei Abbruch der Messung ungefähr doppelt so hoch liegt wie die Kurvenschar der bei 5°C aufbewahrten Seren. Auch scheint das Verhältnis der Höhen der Spontanreaktivitäten der bei 37°C aufbewahrten Seren zueinander, dem Verhältnis der Höhen der bei 5°C aufbewahrten Seren zueinander ähnlich zu sein.

Die höchste Spontanreaktivität zeigten nach 8 Tagen bei 37°C Aufbewahrung die Seren Nr. 1, 3 und 4. Die gleichen Seren der 5°C-Untersuchungsreihe wiesen ebenfalls die höchste Spontanreaktivität auf. Ähnliche Beobachtungen lassen die Abb. 10, 11 und 12 zu.

c) Die Reaktivierbarkeit durch PAM der mit E 600 in 3 x 10⁻⁶ molarer Konzentration vergifteten Seren während der Aufbewahrung über 8 Tage bei 5°C im Kühlschrank und bei 37°C im Wasserbad

α) Versuchsergebnisse der mit E 600 vergifteten Seren bei sofortiger Reaktivierung durch PAM (vgl. Tabelle 3 und Abb. 13 - 16)

Die Anfangsreaktivierbarkeit, die am gleichen Tage 80 - 120 min. nach der Vergiftung mit E 600 untersucht wurde, bewegt sich von 68 bis 98 %. Zwischen der Höhe der Normalaktivität und der Reaktivierbarkeit zeigte sich keine Abhängigkeit. Eine Reaktivierung von 100 % wurde nie erreicht. Das kann durch die hemmende Wirkung von PAM bedingt sein. So hat Serum Nr. 4 eine Anfangsaktivität von 121 µl CO₂/Std. und wird nach

totaler Vergiftung wieder durch PAM bis auf 95,5 % der Normalaktivität reaktiviert. Ebenfalls eine niedrige Normalaktivität hat Serum Nr. 5, doch wird hier nach Vergiftung eine Reaktivierungsrate von 67,7 % erreicht. Serum Nr. 3 und 13 zeigen beide sehr hohe Normalaktivitäten, doch wird Serum Nr. 3 zu 75 %, während Serum Nr. 13 sich bis zu 93,5 % reaktivieren läßt.

β) Versuchsergebnisse der bei 37°C über 8 Tage aufbewahrten Seren nach Reaktivierung mit PAM (vgl. Tabelle 3 und Abb. 13 - 16

Die Reaktivierbarkeit durch PAM betrug nach 24 Stunden bei den 20 vergifteten Seren durchschnittlich 57 % der Ausgangsaktivität, wobei die Extremwerte bei 75 % (Serum Nr. 2) und 36 % (Serum Nr. 19) lagen. Auch hier ließ sich kein Zusammenhang zwischen Höhe der Normalaktivität und Abnahme der Reaktivierbarkeit durch PAM feststellen.

Nach 48 Stunden Aufbewahrung im Wasserbad bei 37°C ließ sich die Serumcholinesterase im Durchschnitt noch auf $44,8 \pm 10$ % des Ausgangswertes reaktivieren. Nach 3 - 5 Tagen war bei allen Seren keine meßbare Reaktivierung mehr festzustellen und der Kurvenverlauf war annähernd horizontal. Bei weiteren Messungen schnitten die Kurven der Reaktivierbarkeit durch PAM teilweise die entsprechenden Spontanreaktivierungskurven. Bei den Seren Nr. 20, 17, 5, 8 und 14 näherten sich die Spontanreaktivierungskurven und die Kurven der Reaktivierbarkeit durch PAM bis auf 5 %.

Tabelle III

Die Reaktivierbarkeit durch PAM der bei 5 °C und der bei 37 °C aufbewahrten und mit E 600 vergifteten Seren

Serum	Geschlecht	µl CO ₂ /h Normalaktivität	Anfangs- reaktivier- barkeit			Reaktivierbarkeit nach Aufbewahrung bei 5 °C				Reaktivierbarkeit nach Aufbewahrung bei 37 °C				Tage *)
						nach **) 4,15 Tagen		nach 8 Tagen		nach 24 h		nach 48 h		
			µl CO ₂ /h	% d. Norm.-Akt.	µl CO ₂ /h	% d. Norm.-Akt.	µl CO ₂ /h	% d. Norm.-Akt.	µl CO ₂ /h	% d. Norm.-Akt.	µl CO ₂ /h	% d. Norm.-Akt.		
1	♂	170	150	88	118	70	69	40	94	55	72	42	3	
2	♀	229	195	85	139	64	77	34	152	75	88	38	4	
3	♂	240	181	75	133	55,5	96	40	129	53,5	78	32	4	
4	♀	121	113	93,5	96	80	65	54	78	64,5	64	83	5	
5	♂	153	105	68,7	104	68	56	36,5	92	60	81	53	5	
6	♀	168	136	84	119	71	82	49	95	56,5	80	48	4	
7	♂	181	176	98	128	71	63	35	131	72	106	59	4	
8	♀	195	153	78,5	132	68	97	50	108	55	77	39	4	
9	♂	178	165	92,6	92	52	86	48,5	123	69	105	59	4	
10	♀	225	209	93	143	66	98	45	160	74	120	55,5	4	
11	♂	210	188	89,5	156	74	77	37	88	42	80	38	5	
12	♀	207	198	95,5	144	69	92	44	105	51	70	34	3	
13	♂	216	202	93,5	96	43	80	35	70	31	65	29	3	
14	♀	280	236	84	138	49	87	31	185	66	120	43	4	
15	♂	194	172	98	123	64	90	46,5	122	63	95	54	4	
16	♀	177	170	96	147	83	90	51	104	59	83	57	5	
17	♂	163	146	89,5	94	57,5	57	35	93	57	84	51,5	5	
18	♀	191	163	85	124	65	71	37	112	59	98	51	5	
19	♂	201	158	78,5	111	53	70	33,5	72	36	68	34	3	
20	♀	184	162	88	102	55	68	37	80	43,5	66	36	5	

*) Tage bis keine sichtbare Reaktivierbarkeit durch PAM oder Zunahme der Spontanreaktivierung mehr erfolgte (durchschnittlich 4,15 Tg.)

**) Vergleichsweise wurden die Reaktivierungswerte aus dem Kurvenverlauf der bei 5 °C aufbewahrten Seren zu diesem Zeitpunkt abgelesen (Abb. 13 - 16).

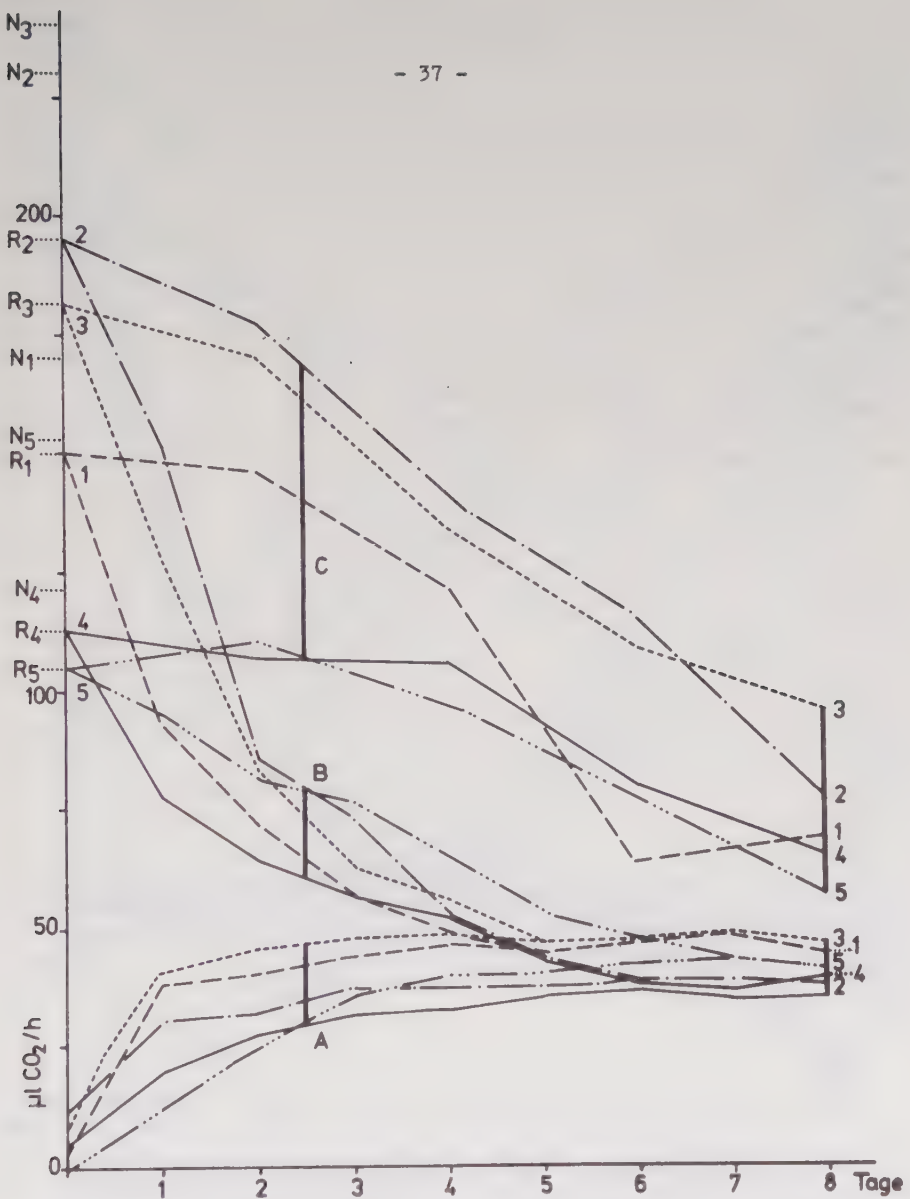


Abb. 13: Seren Nr. 1 - 5 Zunahme der Spontanreaktivierung (untere Kurvenschar A) und Abnahme der Reaktivierbarkeit durch PAM bei Aufbewahrung der Seren bei 37°C (mittl. Kurvenschar B). Die obere Kurvenschar C zeigt vergleichsweise die Abnahme der Reaktivierbarkeit bei PAM bei Aufbewahrung der Seren im Kühlschrank (5°C).

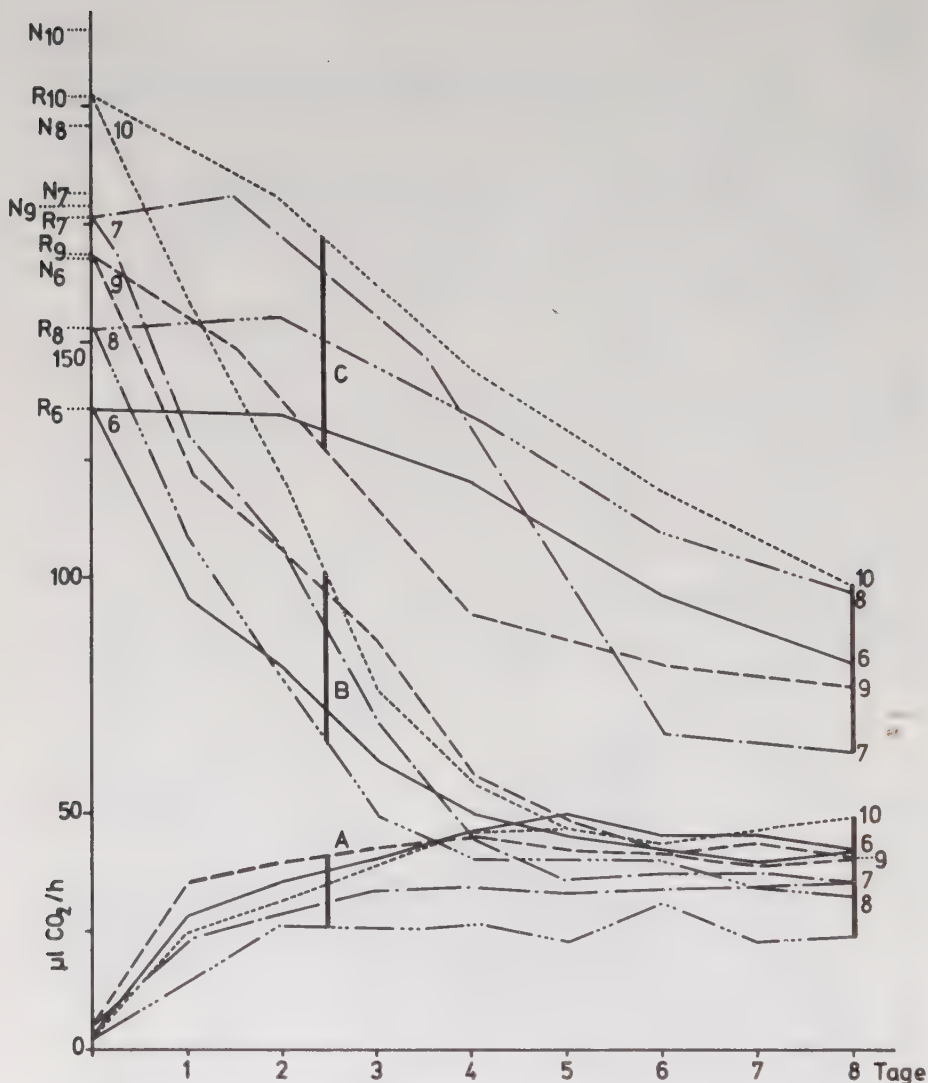


Abb. 14: Seren Nr. 6 - 10 Zunahme der Spontanreaktivierung (untere Kurvenschar A) und Abnahme der Reaktivierbarkeit durch PAM bei Aufbewahrung der Seren bei 37°C (mittl. Kurvenschar B). Die obere Kurvenschar C zeigt vergleichsweise die Abnahme der Reaktivierbarkeit durch PAM bei Aufbewahrung der Seren im Kühlschrank (5°C).

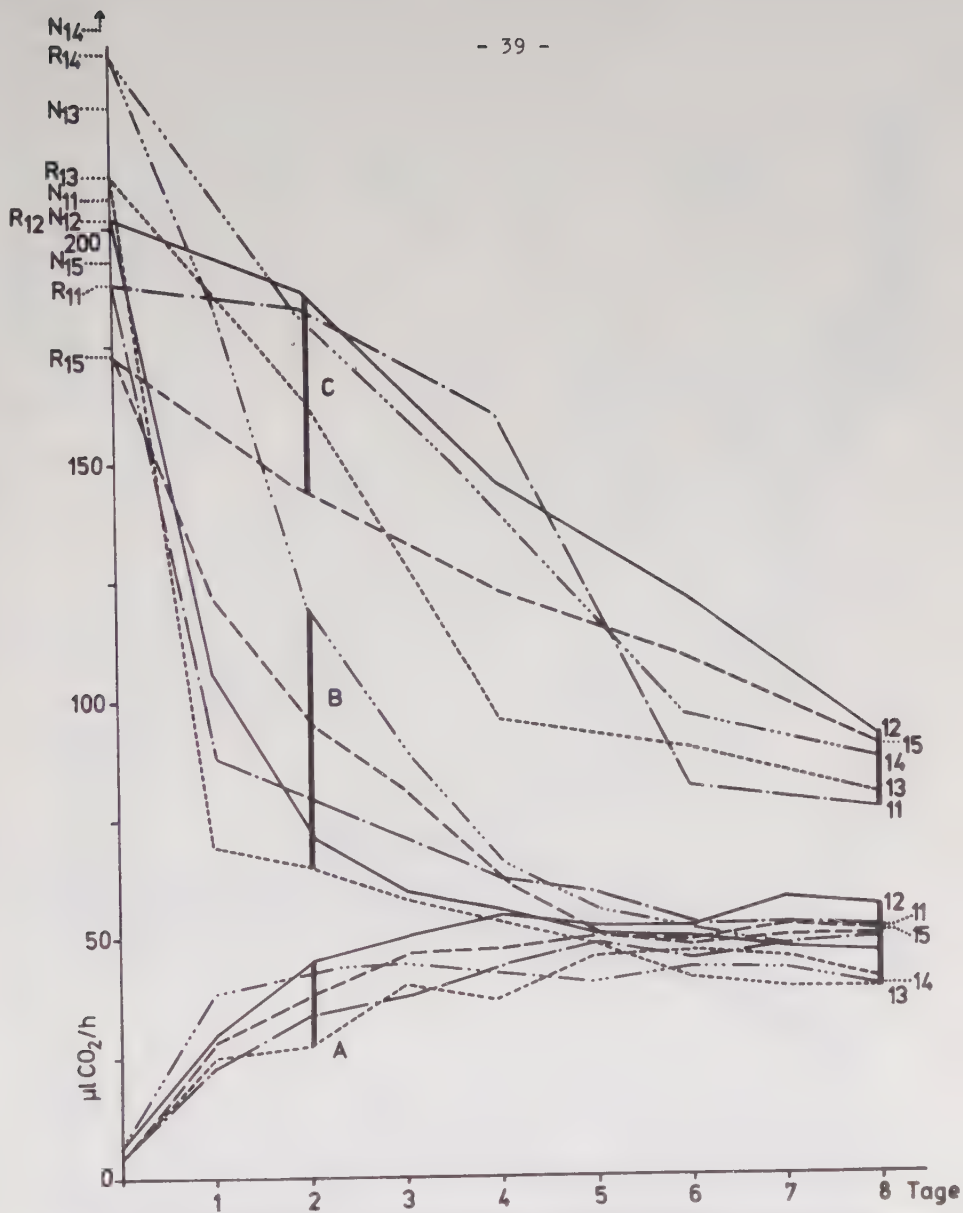


Abb. 15: Seren Nr. 11 - 15 Zunahme der Spontanreaktivierung (untere Kurvenschar A) und Abnahme der Reaktivierbarkeit durch PAM bei Aufbewahrung der Seren bei 37°C (mittl. Kurvenschar B). Die obere Kurvenschar C zeigt vergleichsweise die Abnahme der Reaktivierbarkeit durch PAM bei Aufbewahrung der Seren im Kühlschrank (5°C).

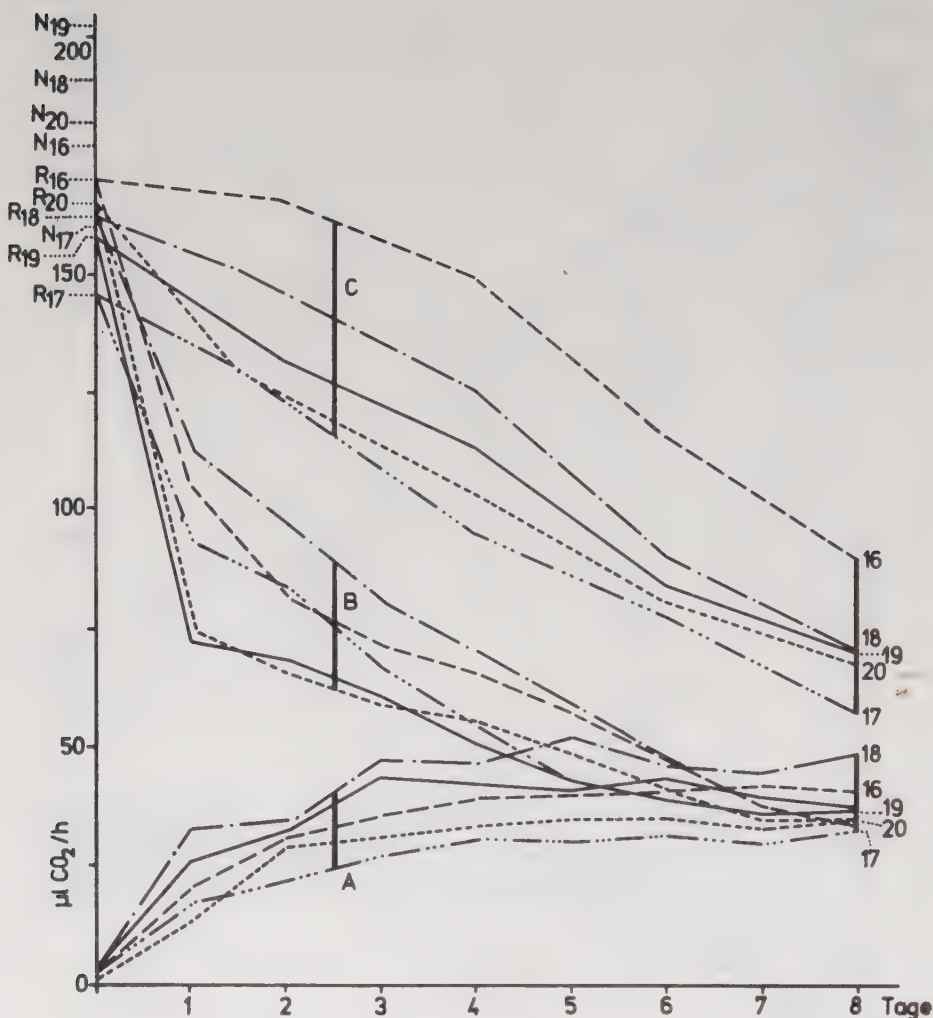


Abb. 16: Seren Nr. 16 - 20 Zunahme der Spontanreaktivierung (untere Kurvenschar A) und Abnahme der Reaktivierbarkeit durch PAM bei Aufbewahrung der Seren bei 37°C (mittl. Kurvenschar B). Die obere Kurvenschar C zeigt vergleichsweise die Abnahme der Reaktivierbarkeit durch PAM bei Aufbewahrung der Seren im Kühlschrank (5°).

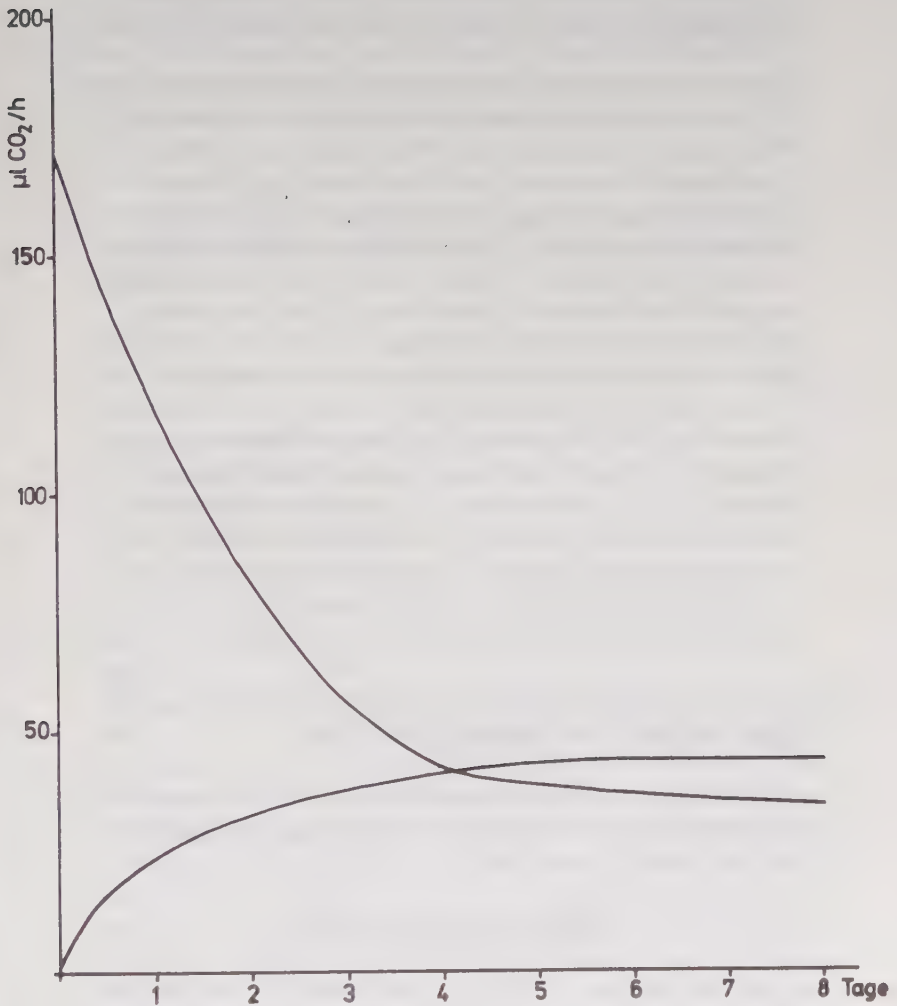


Abb. 17: Schematisierter Kurvenverlauf der Spontanreaktivierung und der Reaktivierbarkeit durch PAM für mit E 600 in 3×10^{-6} molarer Konzentration vergiftete und bei 37°C aufbewahrte Seren.

8) Vergleich der Reaktivierbarkeit durch PAM der bei 37°C aufbewahrten mit den bei 5°C aufbewahrten Seren

Die Abnahme der Reaktivierbarkeit durch PAM läuft bei 5°C wesentlich langsamer, was man durch langsamere "Alterung" oder langsamere Transphosphorilierung bei niedrigerer Temperatur erklären kann. Bei Versuchsabbruch waren alle der bei 5°C aufbewahrten Seren im Durchschnitt bis 41 % durch PAM reaktivierbar. Da die Spontanreaktivierung unter diesen Bedingungen maximal 25 % beträgt (Serum Nr. 4), ist der durch Reaktivierung mit PAM erhaltene Wert deutlich verschieden von dem Wert der Spontanreaktivierung.

Die bei 37°C im Wasserbad aufbewahrten Seren hingegen haben durchschnittlich nach bereits 4,15 Tagen die Kurve der Spontanreaktivierung erreicht. Zu diesem Zeitpunkt hatten die bei 5°C aufbewahrten Seren noch eine Reaktivierbarkeit von durchschnittlich 63,9 %.

d) Vergleich zwischen Zunahme der Spontanreaktivierung und Abnahme der Reaktivierbarkeit durch PAM

Um ein Maß für die Reaktivierbarkeit durch PAM zu erhalten, definierten wir in Anlehnung an Friedberg und Sakai den Index der Reaktivierbarkeit:

$$IR = \frac{\text{PChE-Aktivität ohne PAM}}{\text{PChE-Aktivität mit PAM}}$$

Er ist umso kleiner, je größer die Reaktivierbarkeit durch PAM und je kleiner die Spontanreaktivierung eines vergifteten Serums ist.

Bei unseren Versuchsreihen war der Reaktivierungsindex zu Beginn bei allen Seren = 0 oder nur wenig > 0 , da die Seren total vergiftet waren. Als die Reaktivierbarkeit durch PAM ab- und die Spontanreaktivierung zunahm, stiegen die IR-Werte an und wurden nach 3 - 5 Tagen ≈ 1 .

α) Vergleich von Spontanreaktivierung und Abnahme der Reaktivierbarkeit durch PAM der bei 5°C aufbewahrten Seren

Bei Versuchsabbruch lagen die IR-Werte alle unter 1, d.h. die Reaktivierbarkeit durch PAM ist in allen Fällen größer als die Spontanreaktivierung. U. Rabast hat bei seinen Untersuchungen festgestellt, daß der IR noch nach 62 Tagen bei Aufbewahrung der Seren im Kühlschrank unter 1 bleibt.

β) Vergleich der Spontanreaktivierung und Abnahme der Reaktivierbarkeit durch PAM der bei 37°C aufbewahrten Seren

Die Abb. 13 - 16 stellen den Verlauf der Spontanreaktivierung und der Abnahme der Reaktivierbarkeit durch PAM dar. Bei 75 % der Seren schneiden sich die Kurven der Reaktivierbarkeit durch PAM mit denen der Spontanreaktivierung. Bei Serum Nr. 4, 5, 8, 14 und 17 tangieren sich die Kurven oder laufen parallel. Berücksichtigt man, daß im unteren Meßbereich bis ca. $50 \mu\text{l CO}_2$ Abweichungen von 5 % noch innerhalb der Fehlerbreite der Methode liegen, so bleibt nur die Reaktivierungskurve durch PAM der Seren 8 und 17 sicher über den entsprechenden Spontanreaktivierungskurven. Der Index war sicher in 75 %,

möglicherweise bis 90 % der untersuchten Seren > 1, was sich durch die hemmende Wirkung von PAM auf die Serumcholinesterase bei völlig fehlender Reaktivierbarkeit erklären ließe.

8) Verlauf aller erhaltenen Kurven der bei 37°C aufbewahrten Seren (vgl. Abb. 17) 、

Es wurde versucht, alle Ergebnisse in einem schematisierten Kurvenverlauf darzustellen. Hierzu wurden die Durchschnittswerte der Reaktivierbarkeit durch PAM und der Spontanreaktivierung der mit E 600 vergifteten Seren von den 20 Versuchspersonen zugrundegelegt. Der Schnittpunkt der Kurve der Abnahme der Reaktivierbarkeit durch PAM und der Zunahme der Spontanreaktivität lag bei 4,15 Tagen. Die Kurve der Spontanreaktivierung hatte nach 5,5 Tagen mit 44 μ l CO₂ ihr Maximum erreicht. Die Kurve der Abnahme der Reaktivierbarkeit durch PAM verlief nach 8 Tagen um ca. 10 % unter der Kurve der Zunahme der Spontanreaktivierbarkeit. Dies läßt sich wahrscheinlich auf die hemmende Wirkung von PAM auf die Serumcholinesterase bei völlig fehlender Reaktivierbarkeit zurückführen.

e) Vergleich zwischen Höhe der Anfangsreaktivierbarkeit durch PAM und Zeitpunkt der Beendigung der Reaktivierungsmöglichkeit durch PAM

Die Reaktivierbarkeit durch PAM der mit E 600 in 3×10^{-6} molarer Konzentration vergifteten und bei 37°C aufbewahrten Seren war nicht nach der gleichen Zeit beendet. Dies entsprach auch den Ergebnissen von U. Rabast, der

vergiftete und bei Zimmertemperatur aufbewahrte Seren 8 - 12 Tage lang durch PAM reaktivieren konnte. Diese unterschiedlich lange Reaktivierungsmöglichkeit durch PAM stand in keinem Zusammenhang mit der Höhe der Normalaktivität. Da direkt nach Vergiftung der Seren die Höhen der Reaktivierbarkeit durch PAM bis zu 20 % voneinander abwichen, liegt die Vermutung nahe, daß die Seren, die sich zu Anfang bereits sehr schlecht durch PAM reaktivieren ließen, als erste nicht mehr auf eine Reaktivierung durch PAM ansprechen.

Serum Nr. 3, 8 und 9 ließen sich direkt nach Vergiftung nur bis zu 80 % der Normalaktivität durch PAM reaktivieren und bereits nach 4,4 und 3 Tagen war die Reaktivierungsmöglichkeit durch PAM beendet. Bei Serum Nr. 4, 7, 9, 10, 12, 14 und 16 betrug direkt nach Vergiftung die Reaktivierbarkeit der Serumcholinesterase bis zu über 90 % der Normalaktivität, jedoch erst nach 5, 4, 4, 3, 3 und 5 Tagen ist eine Reaktivierbarkeit durch PAM nicht mehr zu erkennen.

Daraus ließe sich für die erste Gruppe, deren Anfangsreaktivierbarkeit unter 80 % lag, ein Ende der Reaktivierungsmöglichkeit durch PAM nach 3,7 Tagen errechnen. Für Gruppe 2, in der die Anfangsreaktivierbarkeit auf über 90 % stieg, wäre erst nach 4,0 Tagen keine Reaktivierbarkeit mehr möglich.

Das Untersuchungsmaterial ist jedoch zu gering, und die Fehlerbreite zu groß, als daß aus diesen Werten ein sicherer Zusammenhang zwischen der Höhe der Anfangsreaktivierbarkeit durch PAM und dem Zeitpunkt der Beendigung der Reaktivierungsmöglichkeit durch PAM gefolgert werden könnte.

- f) Reaktivierbarkeit der Serumcholinesterase durch PAM direkt nach Vergiftung mit E 600 in 3×10^{-6} molarer Konzentration bei geringerer PAM-Konzentration (vgl. Tabelle 4)

Da das fermentreaktivierende Antidot PAM in Konzentrationen über 5×10^{-3} mol hemmend auf die Serumcholinesterase wirkt (Friedberg und Sakai, 1958), wurde auch das Verhalten der Reaktivierbarkeit der in vitro mit E 600 in 3×10^{-6} molarer Konzentration vergifteten Serumcholinesterase bei geringeren PAM-Konzentrationen untersucht.

Bei einer 5×10^{-4} molaren Konzentration von PAM im Serum lag die Reaktivierbarkeit der Serumcholinesterase durch PAM durchschnittlich 4,4 % unter der einer 5×10^{-3} molaren Konzentration. Eine weitere Verdünnung der PAM-Lösung auf 5×10^{-5} mol zeigte nur eine Reaktivierbarkeit durch PAM von 16 - 41 % der Normalaktivität, während die Reaktivierbarkeit bei 5×10^{-3} mol zwischen 75 und 96 % der Normalaktivität lag. Bei einer $2,5 \times 10^{-5}$ molaren PAM-Konzentration war eine sichtbare Reaktivierung durch PAM nicht zu beobachten.

- II. Die unterschiedliche Reaktivierbarkeit der mit E 600 vergifteten Serumcholinesterase durch eine 5×10^{-5} molare PAM-Lösung und die Beziehung zur fermentativen E 600-Spaltung im Serum (vgl. Tabelle 4)

Geldmacher-v.Mallinckrodt und Lindorf (1969) und Geldmacher-v.Mallinckrodt, Rabast und Lindorf (1969) beobachteten, daß nach einer Inkubation menschlicher Serumcholinesterase mit E 600 in $3,2 \times 10^{-8}$ molarer Konzentration unabhängig von der Ausgangsaktivität

eine Aufteilung in drei Gruppen mit niedriger (0 - 5,5 %), mittlerer (13 - 21 %) und hoher (29 - 51 %) Restaktivität möglich ist. Die Autoren hielten es für denkbar, daß während des Ablaufs der Hemmung menschlicher Serumcholinesterase in vitro durch E 600 in geeigneter Konzentration Unterschiede in der Aktivität eines E 600-spaltenden Fermentes (auch Paraoxonase genannt) die E 600-Konzentration so variieren, daß unterschiedliche, nicht vergiftete Restaktivitäten der Cholinesterase verbleiben, wobei die Cholinesterase selbst keinen Polymorphismus aufweist, sondern als empfindliches Indikatorsystem für die verbleibende E 600-Konzentration und damit die jeweilige Paraoxonase-Aktivität dient.

Wir haben nun Seren mit E 600 ($c = 3,0 \times 10^{-6}$ mol) vergiftet, deren Paraoxonase-Aktivität nach der Methode von Geldmacher-v.Mallinckrodt und Lindorf (1969) sowie nach der Methode von Krisch gemessen worden war. 30 min. nach der Vergiftung wurden die Seren durch eine 5×10^{-5} molare PAM-Konzentration reaktiviert.

In einem Versuchsablauf wurden 3 Seren gleichzeitig gemessen. Jeweils 2 Seren mit hoher Paraoxonase-Aktivität verglichen wir zweimal mit einem Serum niedriger Paraoxonase-Aktivität. Um mögliche Fehlerquellen der Methodik weitgehendst auszuschließen, wurde in einem weiteren Versuch ein Serum hoher Paraoxonase-Aktivität mit 2 Seren niedriger Paraoxonase-Aktivität getestet.

Es zeigte sich, daß Seren hoher fermentativer E 600-spaltender Aktivität sich besser durch PAM reaktivieren ließen als Seren niedriger Paraoxonase-Aktivität. In Versuch 3 der Tabelle 4 ließ sich das Serum hoher Paraoxonase-Aktivität bei 5×10^{-5} molarer PAM-Konzentration

doppelt so hoch reaktivieren wie die Seren niedriger Paraoxonase-Aktivität. Innerhalb eines Versuchsablaufs war eine Korrelation von prozentualer Reaktivierbarkeit durch PAM und Paraoxonase-Aktivität sicher gegeben. Vergleicht man die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsgänge, so entspricht einer hohen Paraoxonase-Aktivität eine Reaktivierbarkeit durch eine 5×10^{-5} molare PAM-Konzentration von 25,6 - 41 %. Bei niedriger Paraoxonase-Aktivität liegt diese Reaktivierbarkeit zwischen 9 und 20 %.

Die unterschiedliche Höhe der Reaktivierbarkeit der mit E 600 in 3×10^{-6} molarer Konzentration vergifteten Seren läßt jedoch nur einen Rückschluß zu auf das Ausmaß der jeweiligen Paraoxonase-Aktivität im Serum, wenn innerhalb eines Untersuchungsganges ein Kontrollserum bekannter Paraoxonase-Aktivität zum Vergleich mitläuft.

a) Die unterschiedliche Reaktivierbarkeit der Serumcholinesterase durch eine 5×10^{-3} molare PAM-Konzentration

Wie die Tabelle 4 der Seren bekannter Paraoxonase-Aktivität zeigt, besteht auch zwischen der Reaktivierbarkeit durch eine 5×10^{-3} molare PAM-Konzentration und der Paraoxonase-Aktivität ein Zusammenhang. Seren, die sich relativ schwer durch PAM reaktivieren ließen, korrelieren immer mit einer niedrigen Paraoxonase-Aktivität. Bei den untersuchten Seren liegt dieser Bereich zwischen 75 und 83 %. Erhaltene Reaktivierungswerte zwischen 90 und 96 % entsprechen einer hohen Paraoxonase-Aktivität.

Tabelle IV

Die Reaktivierbarkeit der mit E 600 in 3×10^{-6} mol vergifteten Serumcholinesterase durch unterschiedliche PAM-Konzentrationen und die Beziehung zur Paraoxonase-Aktivität nach Geldmacher-v.Mallinckrodt und Lindorf bzw. zum E 600-spaltenden Prinzip im Serum nach Krisch

Serum	Geschlecht	ChE-Restakt. in % d. Normalakt. (Geldmacher-v.Mallinckrodt u. Lindorf 1969)	EP-Akt. μ Mol p-Nitrophenol pro Min.u.Liter Serum(Krisch 1968)	Paraoxonaseaktivität	Normalaktivität μ l CO ₂ /h	Reaktivierbarkeit 120 min nach Vergiftung mit E 600 (c = $3,0 \times 10^{-6}$) durch PAM					
						PAM c = 5×10^{-3} mol		PAM c = 5×10^{-4} mol		PAM c = 5×10^{-5} mol	
						μ l CO ₂ /h	% d. Norm.-Akt.	μ l CO ₂ /h	% d. Norm.-Akt.	μ l CO ₂ /h	% d. Norm.-Akt.
Schö.P.	♂	35,0	280	hoch	205	197	96	190	92,5	56	27,2
Schö.I.	♀	38,4	293	hoch	232	210	90	200	86	61	26
Lin.	♀	1,0	120	niedrig	180	148	83	132	73	30	16,7
Geld.M.	♂	3,0	120	niedrig	120	95	79,5	97	81	11	9
Mach.	♀	41,0	199	hoch	164	158	96	142	88	37	25,6
Sch.E.	♂	38,2	253	hoch	172	160	93	149	87	45	29,6
Stock.	♀	1,0	120	niedrig	128	102	80	98	76	21	16,4
Kitt.	♀	40,0	320	hoch	160	152	95	148	92	65	41
Op.	♀	3,0	106	niedrig	110	88	80	83	75,5	22	20

(Die Bestimmung nach Krisch wurde von W. Baumgartner durchgeführt)

Die erhaltenen Reaktivierungswerte der bei 37°C aufbewahrten Seren durch PAM schwankten gleich nach der Entnahme zwischen 75 und 93 % der Normalaktivität. Es liegt nahe, daß diese hohe Schwankungsbreite durch die unterschiedliche Aktivität des E 600-spaltenden Fermentes im Serum bedingt war.

b) Die unterschiedliche Reaktivierbarkeit der mit E 600 in $1,5 \times 10^{-7}$ molarer Konzentration vergifteten Serumcholinesterase durch eine 5×10^{-4} molare PAM-Lösung

Wir vergifteten noch 3 Seren unterschiedlicher Paraaxonase-Aktivität mit einer $1,5 \times 10^{-7}$ molaren PAM-Konzentration. Obwohl das E 600-spaltende Ferment einen Teil des Giftes zerstört, wurde bei dieser Schwellenkonzentration die Serumcholinesterase noch voll vergiftet. (vgl. Geldmacher-v.Mallinckrodt, Rabast und Lindorf, 1969). Diese Seren wurden mit einer 5×10^{-4} molaren PAM-Lösung reaktiviert, wobei trotz niedriger Giftkonzentration nur zwischen 30 und 40 % der Normalaktivität erreicht wurden. Wie die Tabelle 5 zeigt, konnte keine sichere Beziehung zwischen Serumcholinesterase-Restaktivität und Paraaxonase festgestellt werden. Wahrscheinlich war die Übervergiftung so gering, daß das nicht gebundene E 600 bis zur Reaktivierung durch PAM völlig durch die Paraaxonase zerstört worden war und es so zu einer annähernd gleichen Reaktivierung kam.

Tabelle V

Die Reaktivierbarkeit der mit E 600 in $1,5 \times 10^{-7}$ mol vergifteten PChE durch PAM ($c = 5 \times 10^{-4}$ mol) und die Beziehung zum E 600-spaltenden Ferment

Serum	Geschlecht	Paraoxonase-Aktivität	Normal-Aktivität µl CO ₂ /h	Aktivität nach Vergiftung mit E 600 ($c = 1,5 \times 10^{-7}$) µl CO ₂ /h	Reaktivierbarkeit 120 Minuten nach Vergiftung mit E 600 ($c = 1,5 \times 10^{-7}$) durch PAM ($c = 5 \times 10^{-4}$ mol)	
					µl CO ₂ /h	in % der Norm.-Akt.
1	♂	hoch	200	5	68	34
2	♂	hoch	220	0	88	40
3	♀	niedrig	172	2,6	51,5	30

c) Versuch einer Deutung der unterschiedlichen Reaktivierungswerte durch PAM bei den mit E 600 vergifteten Seren

Bei einer 3×10^{-6} molaren Giftkonzentration waren die Pseudocholinesterasen aller Seren vollständig blockiert. Wie orientierende Versuche ergeben haben, waren die Seren etwa um eine ganze Zehnerpotenz übervergiftet. Bei allen Seren befand sich eine bestimmte Menge ungebundenes E 600 in Lösung. Dieser Überschuß wurde nun durch ein für jedes Serum typisches E 600-spaltendes Ferment (Paraoxonase) unterschiedlich zerstört. Bei einer sofortigen Reaktivierung durch PAM entstand

wieder aktive Serumcholinesterase. Da eine direkte Reaktion zwischen E 600 und PAM sehr langsam verläuft (Kewitz und Mitarbeiter), erfolgte durch das in Lösung befindliche E 600 eine neue Hemmung, wobei Unterschiede der Paraoxonase-Aktivität die E 600-Konzentration so variiert hatten, daß unterschiedliche Restaktivitäten verblieben.

Bei einer stärkeren PAM-Konzentration waren die Restaktivitäten der einzelnen Seren nicht deutlich unterschiedlich. Dies mag daher rühren, daß bei einer genügend hohen PAM-Dosis sogar der Teil der Cholinesterase wieder aktiv wurde, der durch die von der E 600-Paraoxonase variierten Giftmenge erneut blockiert war, und so die Zuordnung zu bekannten, durch die Paraoxonase-Aktivität definierten Gruppen niedriger, mittlerer und hoher Restaktivität erschwert wurde.

Diejenige PAM-Menge erscheint ideal, die gerade ausreicht, sich mit dem Enzym-Phosphat-Komplex zu binden und das aktive Enzym freizusetzen. Dann könnte die durch das E 600 -spaltende Ferment (Paraoxonase) variierte Giftmenge optimal zur Wirkung kommen, vorausgesetzt, daß genügend übervergiftet wurde.

D. Diskussion

Friedberg und Sakai (1958) und Friedberg und Erdmann (1959) untersuchten vorwiegend tierische Seren. Menschliches Serum wurde nur in 21 Untersuchungen an 12 Suicidfällen verwendet.

U.Rabast weist daraufhin, daß die Ergebnisse der Spontanreaktivierung bei mit E 600 vergiftetem Pferdeserum (Friedberg und Erdmann) um 30 % höher liegen als die von ihm unter gleichen Bedingungen getesteten menschlichen Seren. Um die Verhältnisse in der gerichtsmedizinischen Praxis nachzuahmen und ähnliche Verhältnisse, wie sie bei E 600- oder E 605-Vergiftungen beim Menschen auftreten, zu erhalten, wurde in unseren Versuchen nur menschlichen Serum verwendet, welches wir mit E 600 vergifteten.

U.Rabast beschreibt in seiner Dissertation einen Suizidfall mit E 605, wo er 10 - 12 Stunden nach Entnahme des Blutes die PChE des noch warmen Serums bestimmen konnte. Die Reaktivierbarkeit durch PAM war entschieden geringer als bei Seren, die in vitro bei Zimmertemperatur vergiftet und reaktiviert wurden. Er diskutiert einen maßgeblichen Einfluß der Körpertemperatur auf die Abnahme der Reaktivierbarkeit durch PAM.

Wie wir in unseren Versuchen zeigen konnten, ist nach Aufbewahrung der Seren bei 37°C die Spontanreaktivierung derartig schnell und nimmt die Reaktivierung durch PAM so rasch ab, daß eine diagnostische Verwertung des Serums bei einer fraglichen Alkylphosphatvergiftung bereits nach 3 - 5 Tagen sehr erschwert wäre.

Man muß berücksichtigen, daß der Leichnam in den ersten Stunden nach dem Tode eine Zeitlang die Temperatur von etwa 37°C hält, und so der Alterungsprozeß der Serumcholinesterase stark beschleunigt wird. Je langsamer die Leiche abkühlt, (im Sommer, im Bett, im überhitzten Zimmer) umso schwerer ist eine mit PAM reversible Hemmung der Serumcholinesterase nachzuweisen.

Die Frage, ob geringe oder gar keine Reaktivierbarkeit durch PAM, wird letzten Endes sicher auch durch die Aktivität des E 600-spaltenden Fermentes Paraoxonase entschieden, wie in vitro-Versuche ergaben.

Für die Praxis empfiehlt es sich, Untersuchungsmaterial so schnell wie möglich abzunehmen und sofort im Eis-schrank bei 5°C zu kühlen. Ein Versand der Serumproben im Sommer ohne Kühlung, wo die Serumcholinesterase bis zu 3 - 4 Tagen höheren Temperaturen ausgesetzt ist, sollte vermieden werden.

E. Zusammenfassung

Wir untersuchten die Einflüsse von Zeit, Temperatur und fermentativer E 600-Spaltung auf eine mit PAM reversible Hemmung der mit E 600 vergifteten menschlichen Serumcholinesterase. Dabei stellten wir folgendes fest:

1. Die Normalaktivität der unvergifteten Seren hatte nach Aufbewahrung im Wasserbad von 37°C über 8 Tage einen Aktivitätsverlust von ca. 24 %. Die Normalaktivität von Kühlschrankseren nahmen über den gleichen Zeitraum unter gleichen Bedingungen um 2,6 % ab.
2. Nach Vergiftung der Seren mit E 600 in $3,0 \times 10^{-6}$ molarer Konzentration erfolgte bei Aufbewahrung bei 37°C eine Aktivitätszunahme, die man als Spontanreaktivierung bezeichnet. Sie war durchschnittlich bei den 20 Versuchspersonen nach 5,6 Tagen (zwischen 3 - 7 Tagen) mit 23 % der Normalaktivität beendet.

3. Bei Vergiftung der Seren mit der oben genannten E 600-Konzentration und Aufbewahrung bei 5°C betrug nach 8 Tagen die Spontanreaktivierung ungefähr 50 % der bei 37°C aufbewahrten Seren.
4. Das Maß der Alterung (Ageing) von Diäthylphosphoryl-Serumcholinesterase, d.h. die Verwandlung von einer reaktivierbaren in eine nicht reaktivierbare Form ist temperaturabhängig und beträchtlich beschleunigt, wenn man die Lagerungstemperatur von 5°C auf 37°C erhöht.
 - a) Bewahrte man die mit $3,0 \times 10^{-6}$ mol E 600 vergifteten Seren bei 5°C auf, so waren sie bei Versuchsabbruch noch nach 8 Tagen zwischen 31 und 54 % durch PAM reaktivierbar.
 - b) Bewahrte man diese vergifteten Seren bei 37°C im Wasserbad auf, so war eine Reaktivierbarkeit durch PAM nach 3 - 5 Tagen, durchschnittlich 4,6 Tagen, nicht mehr feststellbar.
5. Die Spontanreaktivierung und die Reaktivierbarkeit durch PAM hatten nach Aufbewahrung bei 37°C im Wasserbad nach 3 - 5 Tagen die gleichen Werte.
6. Die Spontanreaktivierung nahm nach Aufbewahrung der Seren bei 37°C schneller zu und die Reaktivierbarkeit durch PAM schneller ab als bei Kühlschranktemperatur.
7. Bei einer PAM-Konzentration von 5×10^{-3} mol lag die Reaktivierbarkeit der Serumcholinesterase direkt nach Vergiftung mit E 600 in 3×10^{-6} molarer Konzentration zwischen 75 und 96 % der Normalaktivität.

Bei einer PAM-Konzentration von 5×10^{-4} mol lag die Reaktivierbarkeit durchschnittlich 4 % niedriger.

Bei einer PAM-Konzentration von 5×10^{-5} mol betrug die Reaktivierbarkeit 16 - 41 % der Normalaktivität.

Bei einer $2,5 \times 10^{-5}$ molaren PAM-Konzentration war eine sichtbare Reaktivierung nicht mehr zu beobachten.

8. Die Anfangsreaktivierbarkeit durch PAM war sehr unterschiedlich. Sie differierte z.B. bei einer PAM-Konzentration von 5×10^{-3} mol zwischen 75 und 98 %.
9. a) Seren mit niedriger Anfangsreaktivierbarkeit durch PAM entsprachen Seren mit niedriger E 600-spalten-der Aktivität.
b) Seren mit hoher Anfangsreaktivierbarkeit durch PAM entsprachen Seren mit hoher E 600-spalten-der Aktivität.
10. Seren mit extrem unterschiedlicher Paraoxonase-Aktivität (nach der Einteilung von Geldmacher-v. Mallinckrodt und Lindorf, 1969, Gruppe I und Gruppe III) zeigten nach Vergiftung mit E 600 in 3×10^{-6} molarer Konzentration und anschließender Reaktivierung mit PAM in 5×10^{-3} molarer Konzentration ebenfalls unterschiedliche Vergiftungsgrade der Serumcholinesterase.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen werfen eine Reihe von Fragen und Problemen auf, die nun anhand von Versuchen mit einer größeren Anzahl von Seren geklärt werden müssen:

1. Bleibt vergiftetes und mit PAM reaktiviertes Serum über längere Zeit reaktiviert oder nimmt der Wert ab?
2. Nimmt die Reaktivierbarkeit mit steigender E 600-Konzentration ab?
3. Ist es sinnvoll, ein Serum bis zur möglichen Untersuchung einzufrieren oder wird die Serumcholinesterase durch Einfrieren und Auftauen zu sehr geschädigt, sodaß eine diagnostische Verwertung sehr erschwert ist?
4. Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt einer noch möglichen Reaktivierung durch PAM und der Aktivität des E 600-spaltenden Fermentes Para-oxonase?
5. Nimmt die unterschiedliche Anfangsreaktivierbarkeit durch PAM bei starker E 600-Konzentration zu?
6. Macht sich der Einfluß der Paraoxonase bei höherer Giftkonzentration auf die Anfangsreaktivierbarkeit durch PAM geringer oder stärker bemerkbar?
7. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Spontanreaktivierung und der Paraoxonase-Aktivität?

P. Literaturverzeichnis

Aldrige, W.N.:

Serum esterases.1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination.
Biochem.J. 53, 110 (1953 a)

Aldrige, W.N.:

Serum esterases.2. An enzyme hydrolysing p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera.
Biochem.J. 53, 117 (1953 b)

Ammon, R.:

Die fermentative Spaltung des Acetylcholins.
Pflüg.Arch. ges. Physiol. 233, 486 (1934)

Ammon, R., Zapp, F.J.:

Die einfache klinische chemische Methode zum Nachweis von Cholinesterase im Serum.
Klin. Wschr. 33, 759 (1955)

Augustinsson, K.-B. , Heimbürger, G.:

The enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
Biochem. Biophys. Acta 13, 303 (1954 a)

Augustinsson, K.-B.:

Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds.
IV. Specificity studies.
Acta Chem. Scand. 8, 1533 (1954 b)

Augustinsson, K.-B., Heimbürger, G.:

Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds.
V. Effect of phosphorylphosphatase on the inactivation of cholinesterases by organophosphorus compounds in vitro.
Acta Chem. Scand, 9, 310 (1955)

Berends, F., Posthumus, C.H., Sluys, I.v.D., Deierkauf, F.A.:

The chemical basis of the "ageing process" of DFP-inhibited pseudocholinesterase.

Biochem. biophys. Acta 34, 576 (1959)

Erdös, E.G., Boggs, L.E.:

Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood.

Nature 190, 716 (1961)

Friedberg, K.D., Erdmann, W.D.:

Spontane Reaktivierung der durch Alkylphosphate (Paraoxon, Systox, Isosystox) blockierten Cholinesterase in vitro.

Arch. exp. Path. Pharmacol. 237, 1 (1959)

Friedberg, K.D., Sakai, F.:

Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Alkylphosphaten (E 600, E 605, Systox) in Blut und Hirngewebe mit Hilfe eines fermentreaktivierenden Antidots (Pyridin-Aldoxim-Methjodid, PAM).

Deutsche Zeitschrift für gerichtl. Medizin, 47, 580 (1968)

Geldmacher-v.Mallinckrodt, M., Lindorf, H.H.:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serumcholinesterasen mit Alkylphosphaten.

Vortrag auf der 48. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in Berlin 6.-9.10.1969

Geldmacher-v.Mallinckrodt, M., Rabast, U., Lindorf, H.H.:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serumcholinesterasen mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat).

Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)

Geldmacher-v.Mallinckrodt, M., Baumgartner W., Petenyi, M.,

Burgis, H., Lindorf, H.H., Metzner, H.

Korrelation zwischen der unterschiedlichen Vergiftbarkeit der Serum-Cholinesterase durch E 600 und der Aktivität des E 600-spaltenden Enzym-Systems in menschlichen Seren.

Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiol. Chemie,

353, 217 (1972)

Goedde, H.W., Doenicke, A., Altland, K.:
Pseudocholinesterasen.
Springer-Verlag, Heidelberg, New York 1967

Hobbiger, F.:
Effect of Nicotinhydroxamic Acid Methiodide on Human
Plasma Cholinesterase Inhibited by Organophosphates
Containing a Dialkylphosphatogroup.
Brit. J. Pharmacol. 10, 356 (1955)

Kalow, W., Davies, R.O.:
The Activity of Various Esterase Inhibitors towards
Atypical Human Serum Cholinesterase.
Biochemical. Pharmacology 1, 183 (1958)

Kewitz, H.:
Die Wiederherstellung der Cholinesterase-Aktivität bei
der Alkylphosphatvergiftung durch ein spezifisches Antidot.
Klin. Wschr. 35, 521 (1957)

Kewitz, H., Wilson, L.B., Nachmannsohn, D.:
A specific antidote lethal alkylphosphate intoxication.
II. Antidotal Properties.
Arch. Biochem. 64, (1956)

Krisch, K.:
Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenyl-phosphat
durch menschliches Serum.
Z.Klin. Chem. und klin. Biochem. 6, 41 (1968)

Lorke, D., Kimmerle, G.:
Die Toxikologie der insektiziden Phosphorsäureester.
Pflanzenschutznachrichten Bayer 21, 111 (1968)

Main, A.R.:

The purification of the enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl phosphate (paraoxon) in sheep serum.

Biochem. J. 74, 10 (1960)

Mounter, L.A.:

Some studies of enzymatic effects of rabbit serum.

J. Biol. Chem. 209, 813 (1954)

Robertson, G.S., F.F.A., R.C.S.:

Serum Protein and Cholinesterase Changes in Association with Contraceptive Pills.

Current Contents 10, 104 (1967)

Schaumann, W.:

Bestimmung der Cholinesteraseaktivität in vitro und Berechnung der Aktivität in vivo nach Vergiftung mit Äkylphosphaten.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path. Pharmak. 239, 81 (1960)

Schaumann, W., Schiller, M.:

Inaktivierung von Äkylphosphaten im Gehirn und im Serum.

Arch. Exp. Path. Pharmakol. 239, 114 (1960)

Skrinjarik-Spoljar, M., Reiner, E.:

Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenyl-phosphate and ethyl-p-nitrophenyl-ethylphosphonate by human sera.

Biochem. Biophys. Acta 165, 289 (1968)

Süllmann, H.:

Manometrische Methoden zur Untersuchung des Gewebsstoffwechsels.

Handbuch der Physiologisch- und Pathol.-Chem.Analyse, herausgeg. v. K.Lang und E. Lehnartz, Band VI A, Teil A Springer-Verlag, Berlin (1964)

Zum Schluß der Arbeit erlaube ich mir,
Herrn Professor Dr. Dr. E. Weinig für die
Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut, für
Ratschläge bei der Abfassung der Arbeit
und die Übernahme des Koreferates zu
danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor
Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt für
die Überlassung dieses Themas, ihre unge-
wöhnlich große Hilfsbereitschaft, ihre
zahlreichen Diskussionen und für den jeder-
zeit freundlich erteilten Rat.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn
Dr. Lorke von der Firma Bayer für das zur
Verfügung gestellte E 600.

Lebenslauf

Am 19. November 1943 wurde ich als zweites Kind des Dipl. Ing. Heinrich Lindorf und seiner Frau Gerda, geb. Kreyher in Berlin geboren.

Von Ostern 1950 bis Ostern 1955 besuchte ich die Volksschule in Eschershausen, Kreis Holzminden, und in Heiligenhaus, Kreis Düsseldorf, und anschließend bis Februar 1965 das Gymnasium in Kettwig.

Im Mai 1965 begann ich an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg mit dem Studium der Medizin. Hier bestand ich im Februar 1966 das Vorphysikum, im Juli 1967 das Physikum und im Februar 1971 das medizinische Staatsexamen.

Im September 1967 begann ich gleichfalls an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg mit dem Studium der Zahnmedizin und bestand im November 1968 das Physikum und im September 1972 das zahnmedizinische Staatsexamen.

Am 6.7.1971 promovierte ich zum Dr. med.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990